# ACADEMIE de PARIS

# UNIVERSITE RENE DESCARTES

## FACULTÉ DE MÉDECINE
## NECKER - ENFANTS - MALADES

N°98

Année 1975 — **THÈSE** — N° ___

POUR LE

# DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

M. LEFEVRE ROGER

NE LE 19 FEVRIER 1936 A TOULOUSE

*Présentée et soutenue publiquement le* *19*

MICROANALYSE ET MICROSCOPIE IONIQUES
DES
TISSUS CALCIFIES HUMAINS

*Président : M.* P. ROYER *, Professeur*

# ACADEMIE de PARIS

# UNIVERSITE RENE DESCARTES

## FACULTÉ DE MÉDECINE
## NECKER-ENFANTS-MALADES

Année 1975 **THÈSE** N° ___

POUR LE

# DOCTORAT EN MÉDECINE

(Diplôme d'État)

PAR

M. LEFEVRE ROGER
NE LE 19 FEVRIER 1936 A TOULOUSE

*Présentée et soutenue publiquement le* *19*

MICROANALYSE ET MICROSCOPIE IONIQUES
DES
TISSUS CALCIFIES HUMAINS

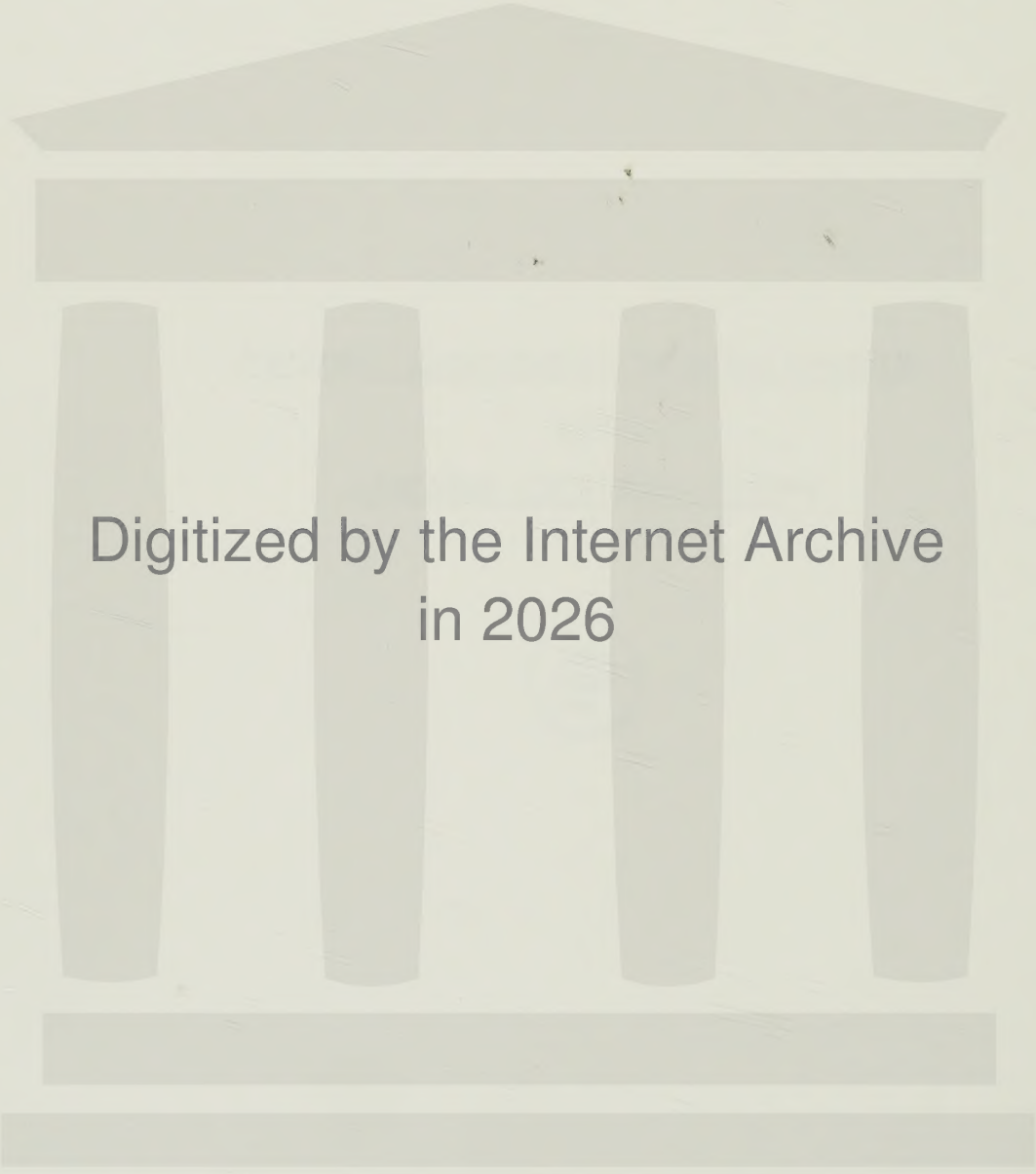
*Président : M.* P. ROYER *, Professeur*

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

# MICROANALYSE ET MICROSCOPIE IONIQUES

# DES

# TISSUS CALCIFIES HUMAINS.


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548117_0008

SOMMAIRE

AVANT PROPOS ..... p 2

CHAPITRE PREMIER : LA MICROSCOPIE ET LA MICROANALYSE PAR EMISSION IONIQUE SECONDAIRE.

I - LA MICROSONDE ELECTRONIQUE : PRINCIPE, POSSIBILITES ET LIMITES ..... p 4

2 - LA MICROANALYSE PAR EMISSION IONIQUE SECONDAIRE ..... p 5

I- Le phénomène d'émission ionique secondaire ..... p 5

2- Principe du microanalyseur ionique ..... p 5

3- Performances actuelles du microanalyseur ionique ..... p 7

4- Limitations actuelles du microanalyseur ionique ..... p 7

5- Description du microanalyseur ionique SMI 300 CAMECA .. p 9

CHAPITRE 2 : PRINCIPALES APPLICATIONS BIOLOGIQUES DU MICRO-ANALYSEUR IONIQUE - ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE ..... p 13

I - LES TRAVAUX EXPLORATOIRES DE P. GALLE ..... p 13

2 - LES TRAVAUX DU LABORATOIRE D'HISTOPHYSIOLOGIE DES INSECTES DE LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS ..... p 14

3 - UN ESSAI D'ANALYSE SEMI-QUANTITATIVE A L'ANALYSEUR IONIQUE DES CONCENTRATIONS DU FLUOR ET DU CALCIUM DANS LES APATITES DES DENTS ..... p 16

CHAPITRE 3 : PREPARATION DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES SOLIDES EN VUE DE L'ANALYSE IONIQUE ..... p 17

I - CONFECTION DES COUPES SERIEES ..... p 18

2 - POLISSAGE DES SECTIONS SERIEES ..... p18

3 - LA CONDUCTIBILITE ELECTRIQUE DES PREPARATIONS ..... p19

CHAPITRE 4 : MICROANALYSE IONIQUE DU TISSU OSSEUX HUMAIN ..... p21

I- MATERIEL ETUDIE ..... p21

2- MICROANALYSE IONIQUE DU TISSU OSSEUX NORMAL ..... p21

3- MICROANALYSE D'UN TISSU OSSEUX PATHOLOGIQUE ..... p23

4- CONCLUSIONS ..... p24

CHAPITRE 5 : MICROANALYSE IONIQUE DU TISSU DENTAIRE HUMAIN ... p 25

I- MATERIEL ETUDIE ..... p 25

2- MICROANALYSE DES DENTS NORMALES ..... p 25

I- Microscopie ionique de l'émail humain normal ..... p 25

2- Microscopie ionique et microdiffraction électronique de la dentine humaine normale ..... p 26

3- Microscopie et microanalyse électroniques par balayage de la dentine humaine normale ..... p 28

4- Spectrogrammes des masses présentes dans le faisceau ionique secondaire émis par l'ivoire et l'émail humain normaux ..... p 29

3- MICROSCOPIE IONIQUE DE L'EMAIL DENTAIRE SUPERFICIEL DANS LA FLUOROSE CHRONIQUE ..... p 30

CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS GENERALES ..... p 31

BIBLIOGRAPHIE ..... p 32

ILLUSTRATIONS ..... p 37

TABLE DES ILLUSTRATIONS ..... p 49

Le sujet d'étude du médecin est nécessairement le malade, et son premier champ d'observation est par conséquent l'hôpital. Mais si l'observation clinique peut lui apprendre à connaître la forme et la marche des maladies, elle est insuffisante pour lui en faire comprendre la nature ; il lui faut pour celà pénétrer dans l'intérieur du corps et chercher quelles sont les parties internes qui sont lésées dans leurs fonctions.

Claude BERNARD, Introduction à
l'étude de la médecine expérimentale.

# AVANT PROPOS.

Les recherches dont les premiers résultats sont exposés dans ce mémoire ont été l'occasion d'une collaboration entre plusieurs laboratoires scientifiques aux préoccupation a priori assez différentes mais qui ont convergé grâce à l'impulsion et au soutien matériel du Centre National de la Recherche Scientifique.

Le Laboratoire de Biophysique de la Faculté de Médecine de Créteil, dirigé par M. le Pr P. GALLE a une orientation instrumentaliste dans le domaine de la microanalyse et de la microscopie électroniques. C'est son directeur qui adapta la microsonde électronique de R. CASTAING (2) à l'étude des tissus biologiques en utilisant le même faisceau électronique pour produire simultanément des raies X caractéristiques et des images par transmission (I3) (I4) ; c'est encore lui qui fut l'initiateur des applications biologiques du microanalyseur ionique de G. SLODZIAN (3I) en y étudiant du tissu rénal et des étalements de globules rouges (I5). Il m'encouragea, alors que j'étais stagiaire à la Clinique Néphrologique du Pr J. HAMBURGER à l'Hopital Necker, à m'orienter vers la microanalyse des tissus biologiques, puis, plus tard, à travailler sur les tissus calcifiés au moyen du microanalyseur ionique.

J'ai profité de la grande expérience de l'Unité de Recherches de l'INSERM sur les Tissus Calcifiés dirigée par Mme S. BALSAN et M. le Pr P. ROYER à l'Hôpital des Enfants Malades. Les manipulations et l'interprétation des résultats des microanalyses ioniques d'os humains ont en effet été faites en collaboration constante avec le Dr G. WITMER dont les travaux en microradiographie sont bien connus et qui a bien voulu explorer en ma compagnie un nouveau domaine de recherches.

Le Centre de Recherches de la Faculté de Chirurgie Dentaire de Strasbourg a été mon troisième soutien médical. M. le Pr. R. FRANK, pionner de la microscopie électronique puis de la microanalyse dentaires (11), m'a encouragé et conseillé à la fois pour le choix des zones à analyser sur les dents qu'il me confia et pour l'interprétation des résultats de leur microanalyse ionique. C'est encore dans son Centre de Recherches que M. J.C. VOEGEL a effectué les microdiffractions électroniques qui ont corroboré mes propres résultats (24) (25).

Le Centre National de la Recherche Scientifique a accepté, dans le cadre de l'Action Thématique Programmée "Physiologie des Tissus Calcifiés", le projet d'"Etude de la répartition des éléments minéraux dans l'os et la dent au moyen de l'analyseur à émission ionique secondaire" que le Pr. P. GALLE et moi-même avions élaboré : ainsi furent trouvés les moyens matériels d'une collaboration cohérente entre ces trois laboratoires de recherche médicale sur un thème précis.

Le concours des physiciens du groupe "Emission ionique" que dirige le Pr. G. SLODZIAN au sein du Laboratoire de Physique des Solides d'Orsay a été fondamental pour mener les travaux présentés ici : orienter les recherches, y travailler, en soumettre et en discuter les résultats avec le concepteur de l'appareil sur lequel on manipule dans le cadre d'une équipe de recherche universitaire est

une situation exceptionnelle. J'ai encore profité de l'expérience de tous les chercheurs biologistes, métallurgistes et géologues groupés dans l'Action Spécifique Pluridisciplinaire du CNRS "Analyse Ionique", autre situation exceptionnelle où l'expérience des uns fait avancer les autres dans des domaines unis sur le thème d'une méthodologie physique instrumentale moderne. C'est enfin aussi de la grande expérience de R. DENNEBOUY et de A. SAINT MARTIN dont j'ai profité lorsque le premier prenait les clichés ioniques et que le second les traitait. De même, R. QUETTIER m'a toujours amicalement fait partager son expérience lorsque des problèmes technologiques se posaient pour la préparation des échantillons ou pour la confection des porte-échantillons.

Les techniques de préparation des échantillons durs que sont les os et les dents ont été adaptées de celles que pratiquent quotidiennement MM. JAILLARD et LAMBALAIS, techniciens des ateliers de l'Institut de Géologie d'Orsay : coupes sériées fines obtenues par sciage au fil chargé d'émeris, lames-minces, polissages et évaporations de grilles métalliques ont été effectués selon des procédés classiques en minéralogie-pétrographie.

Je voudrais, avant d'achever cette introduction, essayer de me faire pardonner par mes collègues enseignants et cherchers d'Orsay le surcroît de travail que mes activités médicales leur ont donné ; je dois à la compréhension du Pr. J.H. BRUNN d'avoir ainsi pu cumuler des fonctions dans des conditions parfois difficiles. Mes études médicales m'ont permis de m'enrichir au contact de nombreux maîtres. Parmi ceux-ci, les Prs J. CHARLAS, J. HAMBURGER et P. ROYER occupent une place de premier plan dans mon esprit par la qualité de leur enseignement et par leur conception même de la médecine qu'ils veulent à la fois plus scientifique et plus humaine. J'offre à tous en retour ce travail.

Ainsi, Physique instrumentale et Minéralogie ont été mises à contribution pour une étude de Biologie médicale fondamentale : il s'agissait de tester les possibilités d'une méthode de microanalyse élémentaire ponctuelle : la microanalyse par émission ionique secondaire, en l'appliquant aux tissus calcifiés humains, os et dents. J'essaierai, dans les pages qui vont suivre, de montrer les possibilités et les limites de cette nouvelle venue parmi les méthodes d'investigation de la matière et de commenter les premiers résultats de mes recherches dans ce domaine.

# CHAPITRE PREMIER :

# LA MICROSCOPIE ET LA MICROANALYSE

# PAR

# EMISSION IONIQUE SECONDAIRE

Si les inventions des microscopes optiques puis électroniques à transmission et à balayage ont permis de pénétrer de plus en plus profondément dans les structures de la matière vivante ou minérale, elles n'ont pas permis d'en donner directement et simultanément la composition chimique locale "in situ" (I). C'est pour tenter d'offrir une telle information qu'on été mis au point la Microsonde électronique par R. CASTAING (2) puis le Microanalyseur ionique parG. SLODZIAN (3I). Dans la première, les éléments chimiques sont identifiés par le rayonnement X caractéristique qu'ils émettent lorsqu'on les bombarde d'électrons rapides ; dans le second, ces éléments chimiques sont arrachés à l'objet étudié, sous forme d'ions émergents secondaires, par un bombardement primaire, puis identifiés par spectrographie de masse. Il n'est pas inintéressant de savoir comment, historiquement, les limites d'emploi de la microsonde électronique sont à l'origine des recherches qui ont abouti à la mise au point de l'analyseur ionique par une même équipe de chercheurs de la Faculté des Sciences d'Orsay, d'autant plus que nous aurons l'occasion de comparer les performances des deux instruments sur les mêmes échantillons au cours de ce travail.

## I - LA MICROSONDE ELECTRONIQUE : PRINCIPE, POSSIBILITES ET LIMITES (2) (3)

L'analyse par microsonde électronique se propose donc, comme je l'ai dit plus haut, d'identifier etde doser les éléments chimiques par le rayonnement X qu'ils émettent sous bombardement électronique. Un faisceau électronique très fin (I $\mu$m ou moins) excite un petit volume de matière qui émet d'une part un spectre continu et d'autre part des raies caractéristiques des éléments présents au point d'impact.

L'analyse quantitative à la microsonde électronique se fait en comparant les intensités de deux raies identiques émises dans les mêmes conditions l'une par l'échantillon analysé, l'autre par un témoin de composition bien connue : le rapport des intensités des raies est égal. en première approximation, au rapport des concentrations. Cependant, des corrections sont nécessaires, qui sont dues :

a) - à l'absorption du rayonnement caractéristique dans l'échantillon

---

(I)- C'est-à-dire sans destruction des structures qui résultent de l'agencement des éléments chimiques, comme le fait malheureusement l'analyse chimique globale classique qui donne une composition sans localisation ou sans histologie dans le cas des tissus vivants.

lui-même ;

b) - à l'émission de rayonnement X excité par fluorescence sous l'action du spectre continu ou des raies caractéristiques des éléments plus lourds que celui qu'on dose ;

c) - au nombre atomique des éléments présents : une matrice formée d'éléments lourds est moins efficace qu'une matrice formée d'éléments légers pour freiner les électrons, mais elle est plus efficace pour diffuser en retour les électrons avant qu'ils n'aient perdu tout leur pouvoir ionisant.

Cette analyse quantitative ponctuelle peut être complétée par une cartographie de la répartition des différents éléments à la surface de l'échantillon étudié : la sonde électronique balaie cette surface et l'image apparait sur l'écran d'un oscillographe dont le faisceau est animé d'un mouvement synchrone et dont l'intensité est contrôlée par l'émission X caractéristique de l'élément recherché.

La méthode a ses limites :

a) - Les éléments très légers (Bore, Béryllium, mais surtout Lithium, Hélium et Hydrogène) échappent à l'analyse ;

b) - la diffusion des électrons dans l'échantillon limite le pouvoir de résolution spatiale (en surface et en profondeur) à I ou 2 $\mu$m ;

c) - le spectre continu masque les raies caractéristiques dans le cas des faibles concentrations. La limite de sensibilité en masse ne permet ainsi pas de détecter des teneurs inférieures à I00 ppm ;

d) - l'impossibilité d'avoir rapidement et commodément le catalogue complet des éléments présents en un point ou sur une plage risque d'en faire passer inaperçus, en ne détectant que ceux que l'on cherche en fonction d'une idée préconçue ;

e) - les différents isotopes d'un même élément ne sont pas discernables car ils émettent le même rayonnement X caractéristique ;

f) - enfin la servitude de balayage a pour corollaires une mauvaise définition des clichés réalisés par points et un allongement considérable des temps de pose lorsqu'on désire obtenir des images de distribution des éléments.

C'est surtout cette dernière limitation qui a incités R. CASTAING et G. SLODZIAN à rechercher une méthode dans laquelle les images caractéristiques soient formées par des particules focalisables à l'aide de lentilles, ce qui est impossible avec les Rayons X. Ces recherches ont abouti à la mise au point du microanalyseur ionique.

## 2 - LA MICROANALYSE PAR EMISSION IONIQUE SECONDAIRE (4) (3I) (32) (33)

### I - Le phénomène d'émission ionique secondaire.

Le bombardement d'un échantillon solide par un faisceau primaire d'ions accélérés (I) provoque la pulvérisation cathodique de sa surface :

(I)- L'énergie des ions incidents doit être suffisamment importante pour provoquer une pulvérisation, mais assez modérée pour ne pas provoquer de réactions nucléaires dans la cible. On utilise généralement des énergies de 5 à I0 keV.

une partie des atomes ou groupements d'atomes ainsi arrachés est sous forme ionisée (2). Ces ions secondaires sont caractéristiques des divers éléments présents à la surface de l'échantillon et peuvent donc servir à l'analyse chimique locale de cette surface. Comme il s'agit de particules matérielles, on peut leur appliquer les méthodes analytiques de la spectrographie de masse.

2 - Principe du microanalyseur ionique (fig. I).

Ce phénomène d'émission ionique secondaire a été mis à profit par G. SLODZIAN (3I) pour la construction de son microanalyseur ionique.

Les ions secondaires émergent de la surface de l'échantillon avec une énergie relativement faible : on peut alors les accélérer au moyen d'une lentille électrostatique à émission (ouimmersion) qui les focalise en formant une image globale réelle et agrandie de la surface de l'échantillon. On ne laisse pas se former cette image ; ce serait simplement une reconstitution matérielle et agrandie de la surface de l'objet.

Un spectrographe de masse approprié est chargé de décomposer cette image globale en autant d'images élémentaires qu'il y a de particules ionisées (mono ou polyatomiques) de masses différentes (les isotopes éventuels seront ainsi séparés) : une première déflexion effectue un tri en fonction de la quantité de mouvement des particules ($p = Mv$) qui sont ensuite sélect ionnées par une fente qui n'admet que les particules répondant aux conditions fixées par le champ magnétique du spectrographe. Une réflexion sur un miroir électrostatique permet une deuxième sélection en fonction de l'énergie des particules ($E = I/2\ Mv^2$). Une seconde déflexion fait sortir le faisceau du spectrographe dans l'alignement du faisceau ionique secondaire qui y était entré.

Après son passage dans le spectrographe de masse, l'image filtrée d'une masse donnée est dirigée vers un convertisseur d'images qui transforme les ions en électrons. Ces derniers sont à volonté orientés soit vers un écran fluorescent pour observation dans une loupe binoculaire, soit vers un film photographique pour prises de vues.

Cette première utilisation de l'analyseur ionique décrite dans son principe est celle d'un microscope ionique : il fournit des images dont l'intérêt sera montré plus loin. Mais on peut l'utiliser en véritable analyseur : au lieu de prendre le cliché correspondant à une masse donnée en réglant le spectrographe de façon à la faire passer par la fente de sélection on peut faire varier continuement le champ magnétique de ce spectrographe et enregistrer les courants ioniques correspondant aux masses successives défilant dans la fente de sélection. On obtient ainsi un spectrogramme des masses présentes sur une surface donnée de l'échantillon, surface que l'on peut faire varier de 250 à une dizaine de microns. L'intérêt de cette utilisation est une exploration systématique de l'ensemble de la classification périodique des éléments chimiques, rapide, révélant souvent la présence inattendue de l'un deux (voir fig. 11).

---

(2)- Dans l'émission secondaire se trouvent aussi : des électrons, des photons X et lumineux, des atomes etgroupes d'atomes neutres.

Enfin cette méthode de microanalyse, fondée sur la spectrométrie de masse est érosive ; cette propriété, qui est parfois une gène sérieuse, peut, par contre, être mise à profit pour l'étude des variations de concentration en fonction de la profondeur dans l'échantillon, lorsque l'érosion se fait de façon uniforme sur toute la surface analysée.

3 - Performances actuelles du microanalyseur ionique.

Actuellement, le microanalyseur ionique fournit des informations aux caractéristiques suivantes :

a) - le pouvoir séparateur spatial en surface est meilleur que le micron, pour un champ objet de 250 $\mu$m ;

b) - le pouvoir séparateur spatial en profondeur est de l'ordre de 50 à 100 Å car il n'y a pas de pénétration diffuse des ions analogue à celle des électrons dans une microsonde électronique ;

c) - l'enregistrement d'un ion caractéristique nécessite la pulvérisation de $10^3$ atomes de l'isotope correspondant. La formation d'un point de l'image, (si la précision requise n'est que de $\pm$ 3 % sur la mesure effectuée) nécessite $10^3$ ions; donc $10^6$ atomes de l'isotope recherché. Si cet isotope est, par exemple, à la concentration de I % dans l'échantillon, il faudra $10^8$ atomes de cet échantillon pour former un point de l'image, c'est-à-dire un volume de $10^{-3}$ $\mu m^3$. Le pouvoir séparateur limite est, dans ces conditions, de 0,1 $\mu$m pour une analyse tridimentionnelle (il serait de 1 $\mu$m avec une microsonde électronique).

d) - l'absence de bruit de fond supprime toute limitation de sensibilité aux faibles teneurs. Théoriquement, un dosage de concentrations très inférieures au ppm est réalisable. Pratiquement, nous le verrons plus loin, la présence d'ions polyatomiques limite considérablement cette possibilité. Quoi qu'il en soit, la sensibilité est, pour un grand nombre d'éléments, très supérieure à celle de la microsonde électronique.

En conclusion, l'analyseur ionique se montre supérieur à la microsonde électronique par sa meilleure résolution spatiale en surface et en profondeur, et par sa plus grande sensibilité aux faibles teneurs. Les images obtenues sans balayage, sont elles-aussi meilleures, bien que réalisées en des délais bien plus courts. Enfin, il peut explorer l'ensemble des éléments chimiques, y compris leurs différents isotopes.

4 - Limitations actuelles du microanalyseur ionique.

La conclusions précédente ne doit pas inciter à un optimisme exagéré car la microsonde électronique garde actuellement sa supériorité dans une application essentielle : l'analyse quantitative.

a) - En effet, si l'on admet qu'aux faibles teneurs et dans l'analyse isotopique comparative, les émissions ioniques sont proportionnelles aux concentrations, il n'en n'est plus de même aux concentrations courantes pour des mesures effectuées sur des éléments différents : ces mesures ne sont alors plus comparables entre elles.

b) - le faisceau ionique secondaire transporte, à côté d'ions monoatomiques de masse donnée M, des ions polyatomiques de masse totale M mais formés en réalité par la combinaison de masses plus faibles dont le total est précisément M. Ces ions parasites viennent se superposer aux ions monoatomiques sur les images et les spectrogrammes de masses et incitent à la prudence dans l'interprétation des premières comme ils empêchent dans certains cas de relier directement la hauteur d'un pic à une concentration sur les seconds.

Théoriquement, un spectrographe de masse à haute résolution est capable de distinguer une masse M dûe à un seul atome, de la même masse M dûe à une combinaison polyatomique. Cette dernière accuse en effet un défaut de masse (I) différent de celui de l'atome isolé car elle cumule les défauts de masse de ses atomes constituants. Il apparait alors à la masse cherchée un doublet (ou un triplet, etc ...) de raies au lieu d'une raie unique. Malheureusement, aucun des spectrographes de masse à haute résolution actuellement en fonction n'est capable de faire une analyse locale "in situ".

c) - la nature des liaisons chimiques au sein de l'échantillon étudié influence de façon importante le mécanisme même d'émission ionique secondaire. Par exemple, un oxyde est beaucoup plus émissif que le métal pur correspondant.

d) - Non seulement l'intensité du faisceau ionique secondaire dépend de la proportion d'ions secondaires émis par rapport au nombre d'atomes arrachés (rendement ionique), mais encore de la vitesse de pulvérisation. Cette dernière dépend à son tour de la nature même du bombardement primaire et de son orientation par rapport au réseau cristallin dans le cas des solides non amorphes. On sait, par exemple, et ceci nous intéresse directement dans le présent travail, que les apatites possèdent des canaux dans leur structure, véritables puits dans lesquels les ions incidents pourraient se perdre pour peu que la direction du tir soit dans leur axe, ce qui ne manque certainement pas d'arriver statistiquement assez souvent. Cependant, cet effet de canalisation peut aussi être absent si le bombardement incident amorphise les structures cristallines.

e) - Les échantillons isolants, c'est le cas précisément des os et des dents, écoulent mal les charges électriques accumulées à leur surface, soit par le faisceau ionique incident, soit par le départ des ions secondaires. Il en résulte des complexes effets de charge électrique qui altèrent la qualité des clichés et peuvent parfois simuler des renforcements de concentration (ou, au contraire des déficits) d'un élément étudié alors qu'il n'en n'est rien.
Le même problème d'écoulement des charges électriques existe à la microsonde électronique et il est facilement réglé par l'apposition d'un film très mince et conducteur (graphite, or ...) à la surface de l'échantillon : la pénétration des électrons et des Rayons X permet l'analyse au travers de ce film dont on choisit la nature de façon à ne pas perturber les résultats.

---

(I) - Le défaut de masse correspond à la quantité de matière transformée en l'énergie nécessaire à la cohésion des nucléons au sein de noyau atomique. Tous les atomes accusent donc un défaut de masse, sauf l'hydrogène dont le noyau est formé d'un seul proton.

La même technique de préparation des échantillons n'est évidemment pas possible dans le cas de l'analyse ionique : la méthode est érosive et le film conducteur étranger serait trop vite détruit ou serait trop épais par rapport à la faible pénétration des ions incidents, dont on a vu qu'elle était un réel avantage. De même il interdirait l'émergence des ions secondaires. On tente de remédier à ces inconvénients en déposant à la surface de l'échantillon une grille métallique bien conductrice dans les mailles de laquelle on fait les observations. Mais celà ne supprime pas totalement les effets de charge électrique (bien qu'alors ils s'ordonnent selon le motif de la grille, ce qui permet de les repérer bien plus facilement) et, d'autre part, la grille est elle-même érodée ce qui limite la durée de l'analyse (I). Cependant, de réels progrès sont en cours au Laboratoire de Physique des Solides d'Orsay, dans la maîtrise de ces effets de charge.

Nous pouvons donc faire un premier bilan et dire que si l'émission ionique secondaire fournit le principe d'une excellente microscopie chimique, la spectrométrie des rayons X par sonde électronique fournit celui d'une excellente microanalyse quantitative. L'utilisation simultanée de l'une et de l'autre s'impose donc.

5 - Description du microanalyseur ionique SMI 300 CAMECA (fig. 2).

Le microanalyseur ionique qui a été utilisé dans ce travail est du type SMI 300 (Spectrographe de Masse à Images de résolution égale à 300) construit et commercialisé par la firme CAMECA (92 - Courbevoie, France). Succintement, ses caractéristiques sont les suivantes :

a) - la source d'ions primaires. Il s'agit d'un duoplasmatron. Le gaz d'alimentation (généralement Argon ou Oxygène) y forme un plasma duquel on extrait à volonté des ions positifs ou négatifs ($A^+$, $O^+_2$ et $O^-$ sont les plus employés). Ce faisceau ionique primaire est soumis au jeu de :

I - un double condensateur électrostatique permettant d'obtenir un spot sur l'échantillon variant de 25 à 400 µm environ de diamètre.

2 - deux déflecteurs électrostatiques permettant :

- de centrer ce spot sur la plage à étudier ;
- de corriger l'astigmatisme de ce faisceau primaire ;
- d'effectuer éventuellement un balayage rapide de l'objet par le faisceau primaire pour à la fois homogénéiser et abaisser la densité du bombardement le rendant ainsi moins érosif.

L'intensité ionique primaire est mesurée par un cylindre de Faraday. Le potentiel accélérateur des ions primaires est réglé à

---

(I) - L'expérience montre que des coupes histologiques de tissus tendres suffisamment minces (I à 2 microns) et lacunaires, déposées sur un support conducteur peuvent se passer d'une grille conductrice lors de leur microanalyse ionique (39). Les tentatives d'analyse de coupes fines de tissus calcifiés dans ces conditions ont jusqu'à présent donné des résultats de qualité inférieure à celles préparées selon les techniques décrites dans ce mémoire.

IO kV environ. Le faisceau primaire aborde l'échantillon obliquement (30°) par rapport au plan de l'échantillon et son énergie est de 5,5 KeV quand il arrive sur la cible.

b) - Le compartiment objet. L'objet étudié, généralement sous forme d'une rondelle ou d'un petit cylindre de I6 mm de diamètre et d'une hauteur maximum de I cm environ, est logé dans un porte-objets avant d'être introduit dans l'appareil.

Cette introduction se fait par ouverture du hublot d'un sas, chambre intermédiaire entre l'air ambiant et le système de vide interne, de petit volume et en relation avec un groupe de pompage rapide. Après la mise en place, la fermeture du hublot et le pompage à l'intérieur du sas, l'objet est introduit automatiquement dans l'enceinte générale dès que les vides se sont équilibrés entre cette dernière et le sas. On peut dès lors et à volonté au moyen de commandes extérieures :

I - observer l'objet, éclairé par une source lumineuse, à travers la vitre du hublot, au moyen d'une lunette de visée (x70). L'observation se fait à angle droit par l'intermédiaire d'un prisme et par réflexion lumineuse et non par transmission, ce qui est une gêne importante pour le repérage des structures histologiques. L'idéal serait évidemment un éclairage par transmission avec de plus une possibilité d'observation en lumière polarisée-analysée. Cependant, la conception actuelle de l'appareillage interdit au constructeur la mise en place d'une source lumineuse et d'un polariseur dans l'espace situé derrière l'objet qui est déjà fort encombré.

2 - déplacer manuellement l'objet dans son plan selon deux axes de coordonnées rectangulaires de façonà sélectionner la région à analyser de manière précise et à l'amener à la croisée des réticules de la lunette d'observation.

3 - amener l'objet en position "analyse", c'est-à-dire sous le faisceau ionique primaire. Dès lors, son déplacement ne peut être que mécanique par une commande automatique située à portée de la main de l'observateur de l'image ionique.

L'objet est porté à la haute tension d'accélération des ions secondaires (4,5 kV)et la collection de ces derniers se fait perpendiculairement à sa surface.

c) - La lentille à immersion (ou émission). Sonrôle est d'accélérer les ions secondaires et de former une image globale réelle de la surface de l'échantillon avec un grandissement de quelques dizaines de fois. L'accélération se produit donc entre l'objet porté au potentiel de 4,5 kV et la première électrode de cette lentille, qui est à la masse. A la suite (au "cross-over") de la lentille se trouve un diaphragme destiné à limiter les aberrations du système optique résultant du fait que tous les ions secondaires ne quittent pas la surface de l'objet avec la même vitesse initiale et n'ont donc pas la même énergie. Il joue de plus le rôle de la "fente d'entrée" d'un spectomètre de masse classique.

d) - Le spectromètre de masse. Il est d'un type particulier par ses propriétés focalisatrices. Son rôle est de décomposer l'image ionique globale en autant d'images élémentaires qu'il y a de masses différentes dans le faisceau secondaire. Pour ce faire, ce dernier subit successivement :

I - une première déflexion dans un prisme magnétique ; il y a alors tri en quantité de mouvement ($P = Mv$) par une fente de sélection qui joue le rôle de "fente de sortie" du spectromètre.

2 - une réflexion sur un miroir électrostatique qui effectue un tri en énergie ( $E = I/2\ Mv^2$) car il est réglé à un potentiel égal à 4,5 kV + v (v de l'ordre d'une vingtaine de volts) pour ne réfléchir que les ions dont la vitesse est inférieure à un certain seuil, les ions trop rapides étant éliminés.

3 - une deuxième déflexion dans un deuxième prisme magnétique est destinée à ramener le faisceau secondaire doublement filtré dans un axe convenable.

Le double prisme magnétique est constitué d'un électro-aimant dont les pièces polaires sont sous vide ; l'entrefer est de 5 mm et le rayon moyen de déflexion de II0 mm.

e) - Le convertisseur d'images. Il comprend :

I - une lentille de post-accélération ;

2 - une lentille de projection ;

3 - le convertisseur proprement dit, constitué d'une lentille à immersion dont la cathode frappée par le faisceau d'ions émet des électrons secondaires. Il est porté au potentiel de 43 kV.

Ce convertisseur d'images peut être utilisé de plusieurs façons différentes :

I - pour l'observation de l'image. Le faisceau électronique secondaire est envoyé sur un écran fluorescent où se produit l'ultime transformation : électrons-photons. Cet écran est observé au moyen d'une lunette binocculaire (xI0).

2 - pour la prise de clichés. Le faisceau électronique est reçu directement sur le film sensible aux électrons, d'une caméra placée à l'intérieur du convertisseur. Les temps de pose varient généralement de I/5 à I00 secondes ou plus.

Ces deux premiersmodes d'utilisation font de l'appareil un microscope ionique.

3 - pour la mesure du courant ionique. L'écran fluorescent est alors escamoté et le faisceau électronique frappe un scintillateur couplé à un photomultiplicateur placé à l'extérieur de l'appareil. La mesure du courant correspondant à chaque masse permet ainsi l'utilisation de l'appareil en spectromètre de masse. La variation continue de l'induction magnétique dans le spectromètre et l'enregistrement simultané des courants ioniques permettent ainsi d'explorer la totalité des masses présentes dans le faisceau secondaire et de réaliser ainsi un spectrogramme de masses sur un papier dont on règle la vitesse de déroulement.

Grâce à des diaphragmes on peut limiter à un pinceau plus ou moins fin le flux électronique reçu par le scintillateur correspondant ainsi à l'émission d'une plage plus ou moins grande sur l'objet (de I25 à une dizaine de $\mu$m).

C'est au moyen d'un prisme magnétique mobile de déflexion du faisceau électronique issu du convertisseur que l'on peut, par une commande extérieure qui le fait tourner autour de l'axe du convertisseur, amener l'image électronique soit sur la caméra, soit sur l'écran fluorescent ou le scintillateur.

f - Le système de vide. Un groupe de pompes primaires à palettes et de pompes secondaires à diffusion d'huile assure un vide de l'ordre de $10^{-7}$ mm de mercure dans le corps principal où se situe la quasi-totalité du trajet des ions et de l'ordre de $10^{-6}$ mm de mercure entre l'objet et la lentille à émission.

Armés d'un tel instrument, les biologistes ont exploré ses possibilités : on peut dire qu'actuellement cette phase exploratoire n'est pas terminée. Mais de grands axes de recherches se sont dessinés, fruits du hasard, des goûts et des préoccupations antérieures des chercheurs et aussi de l'élimination de problèmes trop complexes ou de matériels trop difficiles à préparer. Nous allons examiner quelques-unes de ces applications.

# CHAPITRE 2

## PRINCIPALES APPLICATIONS BIOLOGIQUES

## DE

## MICROANALYSE IONIQUE.

## ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE

### I - LES TRAVAUX EXPLORATOIRES DE P. GALLE (I5) (I6) (I7) (I8) (I9)

C'est sur les montages expérimentaux de G. SLODZIAN que P. GALLE tenta les premières applications de la microanalyse ionique à la biologie et non sur l'appreil tel qu'il est actuellement commercialisé par la firme CAMECA.

La préparation des échantillons biologiques, isolants, était variable selon leur épaisseur : les plus épais recevaient par évaporation sous vide une grille métallique, les plus minces (I µm) étaient simplement déposés sur un support conducteur (acier inoxydable poli) ; l'écoulement des charges électriques accumulées par le faisceau primaire et par le départ des ions secondaires se faisait donc soit par la grille métallique, soit directement dans le support conducteur. P. GALLE a surtout utilisé cette seconde méthode.

Deux types de tissus ont ainsi été étudiés (I5) (I7) (I8) : tissu rénal du lapin et globules rouges humains. Le tissu rénal est fixé "in vivo" par versement direct d'isopentane (-I[illegible]°) sur l'ouverture intrapéritonéal, coupé au microtome à congélation (-[illegible]°), puis deshydraté au froid et sous vide.

L'émission ionique secondaire du sodium par le tissu rénal varie tout au long de l'expérience : le milieu extracellulaire (lumière des tubules et milieu intersticiel) apparaît le plus brillant au début et s'estompe en I0 secondes. Le milieu cellulaire se voit alors mieux : plages très brillantes (noyaux, 2 minutes) sur fond moins brillant (cytoplasme, I0 minutes). Enfin, la paroi des artérioles apparaît extrêmement brillante pendant I5 minutes. C'est là une belle démonstration de la variabilité des vitesses d'érosion de structures différentes. Mais c'est aussi le constat de l'impossibilité de relier directement composition chimique et brillance instantanée des images ioniques. La nécessité d'intégrer la totalité des signaux émis tout au long de l'érosion est soulignée par P. GALLE si l'on veut tenter de donner une interprétation quantitative de l'analyse (I).

---

(I) - On peut théoriquement éliminer ce handicap en étudiant les rapports des intensités des divers éléments issus d'une même plage (cf. Supra : Performances et limitations actuelles de l'analyseur ionique).

La même émission ionique secondaire du sodium par un étalement de globules rouges montre d'abord des plages très brillantes au niveau du plasma sur lesquelles les globules sont plus sombres. Au bout de trois minutes le plasma a disparu. Les globules mettent une quinzaine de minutes à disparaître.

Une très belle application de l'analyse ionique isotopique est faite sur ces mêmes globules rouges : P. GALLE réalise des images de répartition des ions $^{39}K$ et $^{41}K$.

Une étude de la thyroïde de Rat fut ensuite faite (I9) sur coupes semi-fines (2 à 4µm) déposées, après coagulation, sur support en silicium. Les images montrent les vésicules entourées par les noyaux des cellules et, entre les deux, le cytoplasme. L'érosion fait disparaître successivement noyaux, cytoplasme puis vésicules. Des images des ions secondaires négatifs $^{127}I$, $^{35}Cl$, $^{32}S$ et $^{16}O$ sont réalisées avec un bombardement primaire d'azote positif ($N_2^+$): l'iode est localisé dans les vésicules comme l'oxygène. Par ailleurs, les ions sodium et potassium ont la même localisation, phénomène d'uniformisation attribué à la décongélation locale des tissus sous la pression du couteau du microtome.

Des globules rouges de Grenouille, qui ont la propriété d'être nucléés, ont aussi été étudiés par P. GALLE (I6) par étalement sur un support d'or et bombardement à l'Argon, Les images sodium montrent d'abord le plasma et les noyaux, premier ensemble très brillant, et un cytoplasme sombre. En 3 minutes le plasma disparaît, puis les noyaux et enfin le cytoplasme qui persiste I5 minutes. Des images fer ont aussi été réalisées.

Ces premières études ont ouvert la voie aux autres applications de la microanalyse ionique à la Biologie, en illustrant de façon spectaculaire les possibilités de cette nouvelle méthode. Pour la première fois, les biologistes pouvaient reconnaître facilement les objets analysés : l'histologie ionique, bien que purement qualitative, montrait de façon éclatante sa supériorité sur les clichés flous obtenus à la microsonde électronique après de fastidieux balayages et encombrés d'un fond continu parasite.

## 2 - LES TRAVAUX DU LABORATOIRE D'HISTOPHYSIOLOGIE DES INSECTES DE LA FACULTE DES SCIENCES DE PARIS (20) (38) (39) (40) (4I)

Lors de l'une de ses premières études effectuées à l'analyseur ionique sur des coupes histologiques M. TRUCHET constata de façon fortuite sur le foie de Grenouille, bombardé à l'argon une émission d'aluminium et de silicium, éléments réputés peu abondants (Al) ou même soupçonnés (Si) d'être le résultat de contaminations secondaires, sauf dans des tissus accumulant des poussières atmosphériques (et alors associés au titane), ce qui n'est évidemment pas le cas du foie de la Grenouille. Cette observation l'engagea, en compagnie de R. MARTOJA (4I), à vérifier la réalité de la présence de ces éléments et à préciser leur localisation histologique au moyen de la microsonde électronique et de l'analyse histochimique classique. Ces éléments se sont révélés à la microsonde électronique être localisés à des teneurs élevées uniquement au niveau des macrophages de l'organe, tandis que la réaction à l'aluminon donnait des résultats constamment négatifs. L'analyseur ionique était donc l'instrument de la mise en évidence rapide et inattendue grâce à ses performances de visualisation, la

microsonde électronique celui de la confirmation guidée.

Une première tentative de systématisation des résultats des microanalyses ioniques fut faite ensuite par M. TRUCHET (38). Deux grandes séries d'éléments ont des comportements différents : C, O, N, Al, Cl, K, Ca, P, Mn, et Ba, peuvent être détectés sans grandes difficultés, tandis que Mg, S, Fe, Sr, Zn, et Cu sont plus difficiles à caractériser à cause des ions polyatomiques auxquels ils donnent naissance.

A.Y. JEANTET, R. MARTOJA et M. TRUCHET (20) ont ensuite étudié au moyen de la microsonde électronique et du microanalyseur ionique le rôle des sphérocristaux de l'épithélium intestinal de la Fourmi dans la résistance aux pollutions minérales. Les individus ont ingéré Ba, Cu, Pb, Co et Cd. Les résultats apportés plus spécialement par l'analyseur ionique sont les suivants : mise en évidence du baryum en faible quantité et révélation du plomb dans des tissus différents (corps gras, tubes de Malpighi) de ceux dans lesquels la microsonde les révèle.

La thèse de 3° cycle (Spécialité Histologie) de M. TRUCHET (39) est une étude systématique du comportement de 37 éléments des coupes histologiques à l'analyse ionique. Ces comportements l'amènent à parfaire sa classification de I973 (38) et à répartir les éléments en 6 groupes :

I - C, H, O, N, Na, P, Cl, K et Ca sont naturellement présents et habituellement détectés dans les coupes histologiques. Ils constituent le "spectre de base de toute coupe histologique", sorte de "bruit de fond biologique" sur lequel tout autre élément qu'eux se détachera, manifestant sa présence par une raie inhabituelle et une déformation du "faciès" de ce spectre de base ;

2 - Mg, Al, Mn, Fe, Sr et Ba sont naturellement présents dans les coupes mais ne sont qu'occasionnellement observés ;

3 - Si, S et I ne peuvent être observés qu'à très forte concentration ;

4 - V, Co, Ni, Cd, Pb et Bi ont été étudiés en augmentant artificiellement leur concentration chez le vivant (cf.(20)) ;

5 - Cr, Cu, Ag, Ru, N, Os et Hg ont été augmentés par traitement histochimique. Dans ces deux derniers groupes figurent des constituants ordinaires de la matière vivante, mais ils n'ont jamais pu être détectés à l'état naturel ;

6 - Zn, As, F, Li, Be, B, Pt et Au ont simplement été explorés sans qu'une étude systématique en soit faite.

M. TRUCHET (40) a réexposé récemment ces résultats lors des Journées d'étude de la Royal Microscopical Society et de la Société Française de Microscopie Electronique consacrées aux techniques et applications de la microanalyse en Biologie, qui se sont tenues à Créteil.

## 3 - UN ESSAI D'ANALYSE SEMI-QUANTITATIVE A L'ANALYSEUR IONIQUE DES CONCENTRATIONS DU FLUOR ET DU CALCIUM DANS LES APATITES DES DENTS (26) (30).

G. FROSTELL, J.M. GOURGOUT, A. LODDING et L.G. PETERSSON ont effectué à l'analyseur ionique des essais d'analyse semi-quantitative sur trois types d'apatites biologiques préalablement dosées par les méthodes macroscopiques classiques :

I- un cristal homogène d'apatite contenant en poids 38,6 % de Ca et 3,I7 % de F ;

2- des fragments de dentine et de cément d'une dent de Baleine. La dentine contient 23,5 % de Ca et 0,078 % de F ; le cément I8 % de Ca et 0,I % de F ;

3- deux sections d'émail humain prélevées suffisamment loin de la surface pour avoir de faibles variations de F : 35 % de Ca, 0,009 % de F.

Les expériences ont été faites sous bombardement primaire d'ions $O^-$ et enregistrement des ions secondaires positifs.

Les mesures absolues des concentrations en F et Ca d'après les valeurs des courants ioniques secondaires correspondants sont impossibles car elles sont trop dépendantes des conditions expérimentales, en particulier du bombardement primaire. Par contre, les auteurs admettent pour significatives les comparaisons simultanées des pics de $F^+$ et $Ca^+$ avec ceux d'autres ions de la matrice ($P^+$ ou $Ca^{++}$) : les rapports des hauteurs des pics $^{I9}F^+/^{20}Ca^{++}$, $^{3I}P/^{20}Ca^{++}$, et $^{43}Ca^+/^{20}Ca^{++}$ ne dépendent pas des conditions de bombardement.

Par ailleurs, la variation du rapport $^{I9}F^+/^{20}Ca^{++}$ à travers l'émail humain de la surface vers la limite de la dentine a été étudiée. On note la décroissance de ce rapport et celle de la concentration en F de la surface vers l'intérieur de l'émail. La concentration de F varie ainsi de 3000 à I00 ppm.

Enfin, par érosion ionique à la vitesse estimée d'environ 5 Å/s perpendiculairement à la surface d'une dent de Requin, la concentration en Ca et F en fonction de la profondeur a été étudiée : à la surface, la composition est celle d'une fluoroapatite saturée (3,6 % de F) et la teneur décroît au fur et à mesure de la pénétration.

Pour autant qu'ils soient encourageants pour l'avenir de cette méthode de microanalyse, ces résultats sont encore trop fragmentaires pour être admis sans réserves. De plus, les expériences actuellement menées par G. SLODZIAN et A. HAVETTE à Orsay sur les matériaux isolants montrent que bien des facteurs (potentiel de l'objet, répartition des surfaces isoélectriques dans ce même objet, potentiel du miroir électrostatique, intensité du bombardement ...) interviennent de façon encore mal définie dans l'intensité des courants ioniques secondaires, interdisant pour le moment des comparaisons entre desmesures effectuées sur des échantillons ou des appareils différents ou même à des instants différents. Mais ces limitations sont, espérons-le, seulement temporaires.

# CHAPITRE 3

## PREPARATION DES ECHANTILLONS BIOLOGIQUES SOLIDES EN VUE DE L'ANALYSEIONIQUE.-

Les techniques de préparation employées pour les échantillons d'os et de dents destinés à l'analyse ionique ont plusieurs buts :

I - rendre les préparations transparentes de façon à permettre leur examen histologique au microscope optique en lumière transmise ordinaire ou polarisée-analysée ;

2 - rendre les préparations parfaitement planes et polies pour éliminer au cours de l'analyse tout artéfact dû à une surface irrégulière ;

3 - rendre les préparations conductrices de l'électricité de façon à éliminer les charges électriques que le bombardement ionique primaire et le départ des ions secondaires accumulent à leur surface.

Toutes les préparations de dents ont subi le même traitement préparatoire. Les os normaux, fémurs provenant de nécropsies de jeunes enfants décédés pour des troubles sans rapport avec le métabolisme phospho-calcique, ont été préparés comme les dents. Quant aux os pathologiques, provenant de biopsies de crêtes iliaques d'enfants en insuffisance rénale chronique sous dialyse périodique, ils ont subi une partie seulement du traitement.

Les os et les dents, tissus biologiques solides et durs, formés essentiellement d'apatites, sont assez semblables aux échantillons minéralogiques. Aussi peut-on leur appliquer les techniques de préparation mises au point pour ces échantillons cristallisés mais inertes.

L'examen à l'analyseur ionique ne nécessite ni des coupes ultrafines comme il est indispensable pour un microscope électronique, ni des coupes épaisses comme l'exige la microsonde électronique du fait de la diffusion des électrons afin d'éviter d'analyser ensemble coupe et support.

Il se trouve que l'épaisseur classique des préparations minéralogiques (20 à 30 $\mu$m) est compatible avec les exigences de l'analyseur ionique ; de plus, à cette épaisseur, les préparations sont transparentes ce qui permet de les examiner en lumière transmise au microscope optique ; enfin, à cette même épaisseur, l'examen en lumière polarisée et analysée permet la mise en évidence des différences minéralogiques grâce aux teintes de polarisation caractéristiques de l'échelle de Newton.

La technique employée ici permet de plus d'obtenir des sections sériées, ce qui permet d'étudier l'évolution latérale des structures observées.

La succession des différentes opérations est la suivante :

## I- CONFECTION DES SECTIONS SERIEES.

Il serait possible d'obtenir des sections sériées d'os ou de dents par simple sciage au moyen d'une scie circulaire diamantée. Cependant, cette technique a le gros inconvénient de sacrifier une partie importante du matériel car les disques des scies ont une épaisseur non négligeable (plusieurs millimètres) si bien que le nombre de coupes sériées serait réduit et que les relations entre deux coupes successives seraient moins évidentes du fait de la disparition d'une partie importante du matériel intermédiaire. L'utilisation d'un fil métallique circulaire fin (I/IO de mm) chargé d'émeris ne présente pas cet inconvenient Le fil, refermé sur lui-même, est entraîné par un système de poulies actionnées par un moteur électrique. Il passe dans un bac contenant des émeris dont il se charge et vient ensuite user l'objet. Le tout se fait en milieu humide.

L'objet a été préalablement dressé par usure au tour à polir et la surface dressée a été collée à l'Araldite sur une lame porte-objet en verre. Le fil chargé d'émeris passe au travers de l'objet à une distance de la lame de verre convenable, déterminée par des petites cales métalliques dont l'épaisseur est celle que l'on désire donner à la lame que l'on découpe. Il isole finalement d'un côté la lame de verre porteuse d'une coupe mince de l'objet collée à sa surface et de l'autre le reste de l'objet qui tombe à la fin de la coupe. La surface de coupe est plane et l'on peut reprendre le reste de l'objet ainsi dressé pour le coller sur une autre lame de verre et en couper à nouveau une tranche mince.

Les petites cales qui guident la pénétration du fil dans l'échantillon et déterminent l'épaisseur de la section font, dans le cas présent, IOO µm d'épaisseur. C'est donc aussi l'épaisseur de la préparation.

Un tel procédé permet de faire facilement une dizaine de sections sériées dans une dent entre son sommet et le contact ivoire-pulpe, perpendiculairement à son axe.

Le porte-échantillons de l'analyseur ionique admet des objets circulaires de I6 mm de diamètre. Il faut donc transformer les lames porte-objets rectangulaires de dimensions classiques en rondelles de I6 mm de diamètre. On utilise pour celà une meule.

## 2 - POLISSAGE DES SECTIONS SERIES.

Les sections sériées collées chacune sur leur rondelle porte-objet en verre de I6 mm de diamètre ont une épaisseur d'une centaine de microns. On doit donc les amener à une épaisseur de 30 microns. On

procède pour celà à leur usure sous l'eau au tour à polir sur la platine duquel on répand des émeris (alumine) de granulométrie décroissante. Lorsque l'épaisseur est abaissée à 30 microns, on passe au polissage. Il s'agit simplement d'achever l'opération précédente sur un autre tour approvisionné en pâte diamantée de granulométrie beaucoup plus fine (on achève avec une pâte de granulométrie égale à $\frac{1}{2}$ micron). La préparation est alors non seulement transparente, mais encore parfaitement polie.

3 - LA CONDUCTIBILITE ELECTRIQUE DES PREPARATIONS.

Pour les rendre conductrices, il suffit de mettre à la surface des préparations, naturellement isolantes, un conducteur. On ne peut, comme dans le cas des objets destinés à la microanalyse électronique, revêtir la surface entière d'un film conducteur (carbone, or, aluminium ...) à travers lequel on pratiquerait l'analyse, utilisant ainsi la propriété qu'ont les électrons de pénétrer assez profondément et de diffuser dans l'objet, tout en n'étant pas destructeurs. Le bombardement primaire de l'analyseur ionique, au contraire, est d'une part destructeur car c'est bien de la matière qui est arrachée à l'objet pour être analysée dans le spectrographe de masse, et d'autre part, est peu pénétrant (50 à 100 Å). Un film conducteur continu devrait donc être à la fois épais pour ne pas être détruit instantanément et mince pour être décapé assez vite pour permettre d'aborder l'objet lui-même. Toutes ces raisons font qu'on équipe la surface de la section polie d'une grille conductrice dans les mailles de laquelle s'effectue l'analyse.

L'aluminium s'est avéré être le métal le plus pratique à la fois par la facilité de son évaporation, par son prix de revient modique et par le peu de confusion que sa présence risque d'introduire dans la composition chimique des apatites analysées.

La grille a un pas de 150 microns, largeur déterminée empiriquement pour assurer un bon écoulement des charges électriques tout en ne masquant pas excessivement le champ d'observation qui a 250 microns de diamètre. La largeur des barreaux est d'environ 10 microns, leur épaisseur de 3 à 5 microns.

L'évaporation se fait en deux temps au travers des rainures d'un cache en nickel, rainures précisément espacées de 150 microns. La première évaporation dépose les barreaux parallèles dans une première direction, la seconde à 90° de la précédente. Ces deux évaporations se font sous vide secondaire en mettant la quantité d'aluminium à évaporer dans un serpentin de tungstène dans lequel on fait passer un courant électrique qui l'échauffe. La surface de la section polie a été préalablement dégraissées et dépoussiérée par plongement dans l'acétone et agitation aux ultrasons.

Les préparations provenant des biopsies de crête iliaque étaient incluses dans le métacrylate et il s'agissait des restes des échantillons ayant été coupés au microtome pour les études histologiques et les microradiographies. Les sections de coupe ont été conservées telles quelles et polies directement (sans coupes sériées). Elles ont été meulées pour en faire des cylindres de 16 mm de diamètre et 1 cm de hauteur, avant d'être équipées d'une grille en aluminium.

Rondelles de verre portant une coupe mince de l'objet ou cylindres de métacrylate incluant un objet sont ainsi prêts à être montés dans le porte-objet de l'analyseur ionique, cylindre creux de laiton dont les bords doivent être en contact électrique avec la grille d'aluminium. On a eu au préalable le loisir d'effectuer des repérages sous le microscope de régions particulièrement intéressantes et les marquer par de fins points d'encre de Chine, précaution non superflue eu égard aux difficultés d'observation au moyen de la lunette de visée de l'analyseur.

## CHAPITRE 4

## MICROANALYSE IONIQUE DU TISSU OSSEUX HUMAIN.

Les premières observations effectuées à l'analyseur ionique sur du matériel osseaux ont déjà été publiées ailleurs (22) (23). Je ne réexposerai rapidement ici que les faits essentiels et les plus intéressants.

### I - MATERIEL ETUDIE.

Les échantillons de tissu osseux que j'ai étudiés en compagnie du Dr G. WITMER étaient de deux origines différentes :

1 - Des biopsies de crête iliaque d'enfants insuffisants rénaux en dialyse périodique à la Clinique des Maladies du Métabolisme et du Rein que dirige le Pr. P. ROYER à l'Hôpital des Enfants Malades à Paris.

2 - Des fémurs d'enfants décédés en bas âge à l'Hôpital Saint Vincent de Paul à Paris. Ces os sont considérés comme normaux ; la cause du décès de ces enfants n'avait en effet pas de rapport direct avec des problèmes de métabolisme phosphocalcique ou de squelette (Malformations cardiaques congénitales, péritonites ...)

Comme je l'ai écrit plus haut, les biopsies de crête iliaque furent incluses dans le Métacrylate pour être coupées au microtome en vue des examens histologiques et microradiographiques. Ce sont les chutes de ces biopsies qui ont été directement polies et recouvertes d'une grille d'aluminium.

Les fémurs ont, de leur côté, été sectionnés en coupes sériées montées sur rondelles de verre, puis polies et recouvertes de la grille conductrice.

Je me suis attaché, dans un premier temps, à tenter de dégager une histologie ionique normale avant d'aborder la pathologie du tissu osseux dans le cas particulier de l'ostéodystrophie de l'insuffisance rénale chronique.

### 2 - MICROANALYSE IONIQUE DU TISSU OSSEUX NORMAL. (Fig. 3 et 4).

L'analyseur ionique fournit des clichés qui rappellent fortement l'histologie classique des os et les microradiographies. Il présente cependant l'avantage par rapport à ce dernier moyen d'investigation de dissocier les contributions des divers éléments chimiques constitutifs à l'impression globale des clichés.

La répartition comparée des ions Ca, Mg, Na et K (Fig. 3) est intéressante, car elle montre des renforcements simultanés des diverses concentrations ioniques ; autrement dit, l'os présente des hyperminéralisations locales et non pas des zones enrichies préférentiellement en certains éléments chimiques. Cette observation suggère que les éléments chimiques détectés sont partie intégrante du "cristal osseux", c'est-à-dire qu'il s'agit d'apatite manésienne, sodique et potassique (pour nous limiter aux seuls éléments dont la concentration ou le comportement à l'analyse ionique étaient compatibles avec la prise de clichés). Cette idée est en accord avec les travaux contemporains sur la substance minérale des tissus calcifiés (29) : cette substance minérale est une hydroxyapatite $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ associée sous forme indéterminée à du carbonate de calcium. On sait aussi que les ions $PO_4^{3-}$ peuvent être remplacés par $HPO_4^{2-}$ ou $CO_3^{2-}$, tandis que les ions $Ca^{2+}$ peuvent l'être par $Na^+$, $K^+$ ou $Mg^{2+}$.

Les zones hyperminéralisées sont de deux types :

I - En anneaux concentriques autours des canaux de Havers, reflétant probablement la disposition des cylindres de fibres collagènes sur lesquelles s'incruste la substance minérale apatitique ;

2 - Le long des lignes cimentantes limitant les ostéones.

Les lumières des canaux de Havers et les lacunes ostéocytaires apparaissent évidemment en noir. Cependant, sur les clichés Na et K on note la présence de ces éléments dans les canaux : s'agit-il des résidus de la matière organique contenue dans les vaisseaux sanguins ou d'artéfacts de préparation (résine d'inclusion, par exemple) ? Une réponse définitive ne peut encore être avancée.

Les rapports des temps de pose de Ca ($\frac{1}{2}$ s.) et de Mg (20 s.) donnent une idée grossière des rapports des concentrations en supposant aux clichés des densités optiques équivalentes et à Ca et Mg des rendements ioniques voisins. Ainsi, un rapport égal à I/40 est en accord avec l'ordre de grandeur des résultats des analyses chimiques macroscopiques habituelles (8) (27) (29).

Si les lignes cimentantes apparaissent généralement bien sur les microradiographies, ce n'est, par contre, que par la microanalyse ionique que l'on peut mettre en évidence les anneaux concentriques au sein même de l'ostéone : ni la microradiographie, ni la microdissection avec dosage des éléments chimiques, ni la microanalyse électronique ne les révèlent.

Ainsi, les préparations qui avaient servi aux microanalyses ioniques ont été rééexaminées au microscope électronique à balayage et à la microsonde électronique utilisée en balayage (Fig. 4) :

I - Le microscope électronique à balayage montre les manques de matière correspondant à la lumière des canaux de Havers et aux lacunes ostéocytaires. On peut observer sur les

mêmes clichés la grille d'aluminium déposée à la surface des échantillons.

2 - La microsonde électronique utilisée en balayage montre, elle-aussi, les canaux de Havers, mais par contre, n'apparaissent ni les lacunes ostéocytaires, ni les lignes concentriques hyperminéralisées des ostéones, ni les lignes cimentantes, pour des temps de pose pourtant 16 fois plus longs pour Mg et 1280 fois pour Ca, comparés à ceux des clichés pris avec l'analyseur ionique. L'ensemble des structures histologiques et les différences de concentrations chimiques sont noyées dans le fond continu du spectre X. Leur finesse est à l'échelle de la résolution spatiale de l'analyseur ionique mais pas à celle de la microsonde électronique.

## 3 - MICROANALYSE IONIQUE D'UN TISSU OSSEUX PATHOLOGIQUE. (Fig. 5).

Le choix de biopsies de crête iliaque d'enfants en insuffisance rénale chronique est tout à fait occasionnel ; l'étude d'autres cas pathologiques (Maladie de Paget, rachitisme, ostéopétrose, fluorose ...) est à faire ; elle sort du cadre de ce travail préliminaire.

Les troubles électrolytiques prolongés qui existent dans l'insuffisance rénale chronique ont-ils une traduction au niveau de l'os ? La distribution des éléments chimiques est-elle perturbée par rapport à la distribution normale ? L'examen de la figure 5 apporte quelques données qu'il serait hâtif de généraliser.

Dans la travée osseuse analysée, il semble y avoir dans les zones proches de la moelle une dissociation des répartions chimiques en deux groupes :

1 - Un renforcement local en Mg et K ;

2 - Un appauvrissement concomitant en Na et Ca. Les parties les plus profondes de la travée osseuse sont plus riches en Ca et Na que les parties les plus récentes.

Par contre, les lignes cimentantes ne montrent pas une telle dissociation et conservent l'aspect globalement hyperminéralisé que montrait l'os normal sur la figure 3.

Des explorations systématiques seront nécessaires avant d'interpréter ces résultats. Mais il ne semble pas s'agir d'artéfacts dûs à la méthode microanalytique employée, du genre figures de charge électrique. Les zones enrichies en K et Mg, mais surtout celles appauvries en Na et Ca (surtout Na) ont une répartition histologique : s'il s'agissait de figures de charge électrique elles auraient une répartition admettant pour symétrie celle de la grille d'aluminium. Or, il n'en n'est rien : chaque zone de densité différente est limitée par une ligne cimentante à la géométrie indépendante de celle de la grille conductrice.

## 4 - CONCLUSIONS.

Le microanalyseur ionique permet donc, en des délais extrêmement rapides, de mettre en évidence la structure histologique de l'os normal en révélant les différences de minéralisation au niveau des anneaux concentriques au sein de l'ostéone et au niveau des lignes cimentantes. Des alternances d'épisodes de densités de minéralisation différentes peuvent ainsi être détectées. La concomitance des dépôts de Ca, Mg, Na et K suggère que tous ces éléments font partie intégrante d'une hydroxyapatite, plus ou moins substituée.

Sur le cas pathologique étudié, ce sont des différences de densité minérale d'un ostéone entier à l'autre qui sont révélées. Ce résultat est en accord avec des données classiques qui admettent cette variation de composition de l'os avec l'âge de l'ostéone (8). Mais la dissociation des divers éléments suggère qu'il s'agit d'hydroxyapatites substituées de façon variable selon les ostéones. Il sera évidemment fort intéressant dans la suite de ce travail d'essayer de mettre en relation ces épisodes de densification osseuse variable par des apatites elles aussi variables avec le cours de la maladie et avec sa thérapeutique.

# CHAPITRE 5

# MICROANALYSE IONIQUE DU TISSU DENTAIRE HUMAIN

C'est sur du tissu dentaire que j'ai fait les premières tentatives d'application de la microanalyse ionique aux tissus calcifiés. L'émail de la dent, qui contient les cristaux les plus gros, les plus durs et probablement les plus étudiés et les mieux connus de l'organisme, était en effet un matériel de choix pour qui avait une certaine expérience minéralogique et cristallographique. A l'époque, seul P. GALLE avait exploré l'aspect biologique de l'analyse ionique et seulement sur des tissus tendres.

Les recherches sur l'analyse ionique du tissu dentaire sont actuellement plus prometteuses et ont été plus fertiles que celles, à leur tout début, qui s'appliquent au tissu osseux. Je dois dire aussi que la collaboration scientifique avec le Pr. FRANK et son laboratoire de Strasbourg n'est pas étrangère à ce bilan positif.

## I - MATERIEL ETUDIE.

Trois lots de dents d'origines différentes ont été étudiés :

1 - Des dents normales provenant du service de Stomatologie de l'Hôpital de Villeneuve-Saint-Georges (Pr. SCHEFFER) ;

2 - Des dents normales provenant du Service de Stomatologie de l'Hôpital de Strasbourg (Pr. FRANK) ;

3 - Enfin, des dents de sujets atteints de fluorose chronique, d'origine marocaine (Pr. FRANK).

Il s'agit dans tous les cas uniquement d'incisives, de canines et de prémolaires de la seconde dentition.

Les dents ont été préparées selon les techniques décrites au chapitre 3. Les sections ont été pratiquées perpendiculairement à leur axe.

## 2 - MICROANALYSE IONIQUE DES DENTS NORMALES. (Fig. 6 à 11).

### 1 - Microscopie ionique de l'émail humain normal (Fig. 6) (22).

L'aspect bien connu de l'émail noueux avec ses "bui sons" se retrouve sur les clichés de répartition de l'ion Ca. Les coupes microanalysées sectionnent les prismes de l'émail selon des incidences

voisines de leur axe d'allongement "c". L'aspect en buissons, dû à la torsion des gerbes de prismesapatitiques, est reflété par l'analyse ionique en raison des variations progressives d'orientation cristallographique qui en résultent : les angles d'incidence du faisceau ionique primaire par rapport aux axes des cristaux variant de façon continue, celui-ci se trouve aborder des liaisons d'intensité variable dans la matière. Ainsi, la pulvérisation en surface sous l'effet d'un bombardement ionique est-elle un phénomène complexe dans lequel la concentration d'un élément dans l'échantillon étudié n'est pas le seul facteur réglant l'intensité de l'émission secondaire ; la nature et la force des liaisons intra-cristallines interviennent elles-aussi, ainsi que le phénomène dit de "canalisation" : une partie du faisceau ionique primaire, au lieu d'arracher des ions de la surface du cristal d'apatite, peut se perdre en profondeur en s'engouffrant dans un tunnel ou canal de la structure cristalline et l'on sait que de tels canaux existent et sont combien importants dans les apatites biologiques (29).

L'interprétation de la mise en évidence des "buissons" de l'émail nouveaux par l'analyseur ionique que je viens d'exposer mérite d'être discutée :

a) - dans des composés aussi complexes que les apatites, il est probable que le phénomène de canalisation joue en fait un rôle assez faible. En effet, le bombardement ionique primaire doit "amorphiser" les couches atomiques superficielles, obturant ainsi les orifices des canaux du réseau cristallin ;

b) - la dissociation et l'individualisation des différents prismes d'un "buisson" peut aussi être dûe à l'érosion différentielle du prisme et de sa gaine interprismatique beaucoup moins minéralisée. Un exemple en est donné plus loin dans l'étude de la fluorose chronique (fig. 12).

Sur la fig. 6 on peut enfin noter la différence de minéralisation très nette entre l'émail et la dentine (sauf au niveau des gaines hyperminéralisées péricanaliculaires) : l'émail est beaucoup moins riche en matière organique que l'ivoire, comme le montre la répartition de l'ion Ca.

2 - Microscopie ionique et microdiffraction électronique de la dentine humaine normale (Fig. 7 à 10) (22 à 25).

L'ivoire de la dent normale est perforé de fins canalicules : ces tubules dentinaires, qui contiennent les prolongements des odontoblastes, sont une structure bien classique ; leur lumière s'élargit vers la pulpe et se rétrécit vers l'émail. Observés au microscope optique, ils se montrent entourés d'une gaine circulaire de largeur variable elle-aussi, ne se distinguant du reste de l'ivoire que par une réfringence plus forte, le contact dentine péritubulaire-dentine intertubulaire apparaissant comme un liseré caractéristique des limites de milieux d'indices différents. Cette première observation incite à penser qu'il existe une différence de composition entre les deux dentines.

Au microscope électronique à balayage (fig. 9 et 10) la gaine péritubulaire se singularise à la manière de la margelle d'un puits : c'est probablement le reflet de sa minéralisation et de sa cristallinité plus grandes.

Sur les clichés ioniques, les tubules dentinaires apparaissent régulièrement dispersés au sein de la dentine intertubulaire (fig. 7 et 8). Cette dernière contient Ca et Mg, mais aussi P et Na (cf. (24), fig. 3 et 5).

L'intérêt majeur des images ioniques réside dans la mise en évidence des renforcements péritubulaires en Ca et Mg : anneaux blancs se détachant sur le fond gris et enserrant la lumière noire des tubules. Une teneur plus grande en K et Na a aussi été observée dans ces gaines (fig. 7) (cf. aussi (24), fig. 15, 16, et 17).

Parfois, la lumière des tubules est complètement obturée par l'hyperminéralisation. Un très bel exemple en est visible sur la figure 7. Ce phénomène, connu sous le nom de sclérose dentinaire, peut être observé aussi bien dans des conditions normales que pathologiques (5).

La discussion de cette observation a déjà été faite ailleurs en collaboration avec R. FRANK et J.C. VOEGEL (24) (25). Je me contente donc de la reprendre ici.

La nature hypercalcifiée de la dentine péritubulaire comparée à la dentine inter-tubulaire a été démontrée par microradiographie (1), (5), (6), (7), (37), (42) et par microscopie électronique par transmission (6) (9)(10)(21) (34). Au microscope électronique à balayage, LESTER et BOYDE (44) ont décrit dans la dentine péritubulaire des cristaux grossièrement sphériques ou polygonaux. Le caractère hyperminéralisé de la dentine péritubulaire a été établi à la microsonde électronique et TAKUMA et al. (35) y ont trouvé un renforcement en Ca et P. Utilisant une microsonde électronique associée à un microscope électronique à balayage, MILLER et al. (28) estiment que la dentine péritubulaire comparée à la dentine intertubulaire est hyperminéralisée de 9 % en Ca, P et Mg combinés, quoique bien des tubules ne montrent qu'une différence de seulement 2 à 4 %.

Les observations faites ici à l'analyseur ionique sont donc corroborées par celles de plusieurs auteurs et avec des moyens d'investigation variés. Cependant, aucun instrument n'est actuellement capable de fournir une image chimique aussi évidente des gaines péritubulaires. Même insoupçonnées, elles ne peuvent passer inaperçues de l'utilisateur de l'analyseur ionique. Tout se passe comme si cet appareil arrivait trop tard, tant il aurait évité de balbutiements histochimiques (Les travaux de M. TRUCHET en sont à cet égard une brillante démonstration) ; une exploration histologique systématique s'impose par son moyen afin de guider les contrôles, par exemple les mesures quantitatives à la microsonde électronique ou les clichés de microdiffraction des électrons.

C'est précisément à cette dernière exploration que se sont livrés R. FRANK et J.C. VOEGEL (24) (25) à partir des clichés pris à l'analyseur ionique pour tenter de caractériser cristallographiquement les gaines péritubulaires. Des microdiffractions électroniques de coupes fines transversales de dentine non décalcifiée incluses dans l'Epon et coupées au couteau de diamant, ont été réalisées au moyen d'un microscope électronique JEOL 100 B avec un diaphragme intermédiaire de 10 microns, des systèmes anticontamination et LiF comme standard. Les diagrammes obtenus montrent deux types de figures :

1 - des cercles correspondant à l'hydroxyapatite, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ ;

2 - des points correspondant à la whitlockite, $Ca_3(PO_4)_2$, dont on sait qu'elle peut contenir de faibles pourcentages de MgO (27). Effectivement, les calculs cristallographiques effectués sur les diagrammes (I) permettent d'estimer à 1 % en poids le Mg incorporé à la whitlockite de la dentine péritubulaire.

3 - Microscopie et microanalyse électroniques par balayage de la dentine humaine normale (Fig. 9 et 10).

Des clichés au microscope électronique à balayage ont été réalisés sur les mêmes zones que celles qui ont été microanalysées ioniquement sur la figure 8. Les gaines péritubulaires s'y singularisent par une plus grande densité matérielle, sortes de margelles entourant le puits du tubule. Il est cependant à remarquer que ces clichés ont été pris après le passage sous le bombardement ionique de l'analyseur ; celui-ci a décapé différentiellement les zones de duretés différentes. Cette érosion différentielle met d'autre part en relief, au sein de la dentine intertubulaire, des spicules ou cheminées de fées qui suggèrent que cette dentine elle-même n'est pas homogène.

Une cartographie de Ca et Mg par balayage à la sonde électronique (fig. 9) n'a pas permis de mettre en évidence une hyperminéralisation au niveau des gaines péritubulaires malgré des temps de pose de plusieurs minutes (5 mn pour Ca ; 16 mn pour Mg).

J'ai enfin tenté une traversée en Mg à la même microsonde électronique (fig. 10) afin de mettre en évidence les variations de concentration de cet élément au sein de la dentine. Aucune hyperconcentration magnésienne n'a été notée autour du déficit correspondant à la lumière des tubules. Ceci ne signifie pas que cette hyperconcentration ne puisse pas être mise en évidence par des microanalyses électroniques ponctuelles, mais simplement que l'analyseur ionique fournit des images de meilleure qualité que la microsonde électronique utilisée en balayage, image extrêmement précieuse pour guider des contrôles ponctuels et des mesures quantitatives.

---

(I) - Relation entre la valeur du paramètre de l'axe "a" déduit des diagrammes de microdiffraction électronique et la teneur en Mg (43).

4 - Spectrogrammes des masses présentes dans le faisceau ionique secondaire émis par l'ivoire et l'émail humains normaux. (fig. II) (22).

L'utilisation de l'analyseur ionique en spectrographe de masse sur un champ objet variant de 250 à quelques microns permet de réaliser en quelques minutes l'analyse chimique qualitative d'une région choisie de l'objet étudié.

Les spectrogrammes de masses représentés sur la figure II donnent, pour chaque masse, l'intensité du courant de sortie de l'analyseur ionique, c'est-à-dire une mesure du nombre de particules ionisées d'une masse donnée arrachées par le faisceau incident de la surface de l'échantillon étudié : émail ou ivoire dentaires. Dans chacun des deux cas, un spectrogramme des ions secondaires positifs et un autre des ions secondaires négatifs sont figurés. Leur comparaison permet de voir que certains ions apparaissent plutôt sous forme positive que négative et réciproquement. J'ai noté en clair, pour les masses essentielles, la constitution probable des ions mono et polyatomiques majeurs qui contribuent à la formation des pics. Certains de ces derniers pour les éléments les plus abondants dans les dents, sont saturés pour la gamme de sensibilité du courant collecté choisie ($10^{-15}$A) : celà permet de donner une certaine hauteur aux pics les plus faibles (F, par exemple). Une représentation semi-logarithmique permet de figurer l'ensemble des pics sur toute leur hauteur, mais j'ai préféré, dans ce travail purement qualitatif, laisser certaines informations chiffrées à l'état brut pour donner au lecteur une meilleure idée du fonctionnement d'un analyseur ionique, tout en ayant conscience de l'inexploitabilité quantitative de ces informations, certaines raies étant saturées pourla gamme des courants secondaires choisie.

Un examen rapide de la figure II permet de faire quelques remarques :

1 - Un élément de masse atomique M peut apparaître à la masse M/n s'il est ionisé n fois. Par exemple le Ca de masse 40 apparaît aussi à la masse 20 sous forme $Ca^{2+}$ ;

2 - Les différents isotopes d'un élément s'individualisent facilement : $^{40}Ca$, $^{42}Ca$, $^{43}Ca$ et $^{44}Ca$ ;

3 - Les ions polyatomiques peuvent être formés d'atomes semblables ($O_2$ = 32) ou différents (CaO=56) ;

4 - Certains ions sont plus facilement détectables sous forme poly que monoatomique. C'est le cas du Fluor que l'on détecte plus facilement à la masse 59 (FCa) que 19 (F) ; de même pour 47 (PO) et 31 (P) ;

5 - Enfin, il faut noter que les spectrogrammes d'ions négatifs sont toujours plus pauvres que leurs équivalents positifs.

## 3 - MICROSCOPIE IONIQUE DE L'EMAIL DENTAIRE SUPERFICIEL DANS LA FLUOROSE CHRONIQUE. (Fig. I2).

Je n'ai fait qu'aborder cette étude de pathologie dentaire. J'en présente ici les premiers résultats afin d'illustrer les possibilités offertes par l'analyse ionique dans le champ de la biologie et de la pathologie.

Les dents étudiées (incisives et canines) proviennent de populations marocaines consommant des eaux hyperfluorées et communiquées par le Pr. FRANK de Strasbourg. Elles présentent à l'examen optique des régions superficielles de l'émail colorées en brun, très localisées ou au contraire formant une couronne continue enserrant entièrement un émail interne clair.

L'analyse ionique des parties superficielles, colorées en brun, montre sur des clichés en gros perpendiculaires à l'axe "c" d'allongement des prismes de l'émail, une dissociation de ceux-ci, pourtant extrêmement jointifs sur les dents normales, seulement séparés par une gaine interprismatique mince difficile à mettre en évidence par des moyens classiques. Il semble donc que l'analyseur ionique mette ici en évidence une manifestation morbide de la fluorose chronique : réduction de volume et disjonction des prismes de l'émail, élargissement des gaines interprismatiques, tout ceci peut être en relation avec une dissolution comme on l'observe dans la carie commune (I2).

Le cliché FCa de la figure I2 semble de son côté confirmer les données de LODDING et al. (26) et PETERSSON et al. (30) sur la décroissance de la teneur en F de l'émail de la surface vers l'intérieur de la dent.

Cette étude sur la fluorose chronique est encore au stade exploratoire, mais elle est intéressante car elle débouche directement sur ce problème crucial de la stomatologie qu'est la carie dentaire et sur le rôle que joue le Fluor dans son déclenchement, sa prévention et son traitement.

# CHAPITRE 6

# CONCLUSIONS GENERALES

Ce travail est une des toutes premières tentatives d'application biologique du microanalyseur ionique de G. SLODZIAN. Il a donc à la fois un caractère exploratoire et provisoire. Les résultats en sont un peu disparates, bien que le matériel étudié présente une certaine unité, celle de la nature minéralogique.

1 - La microscopie ionique du tissu osseux permet de mettre en évidence des détails insoupçonnés à la microradiographie et à la microsonde électronique : les lignes concentriques hyperminéralisées au sein des ostéones. Les lignes cimentantes bien classiques par contre, sont elles-aussi présentes sur les clichés.

L'analyseur ionique, s'il dissocie les contributions respectives des ions Ca, Mg, K et Na montre aussi, par la similitude de leur localisation, leur intégration au cristal d'hydroxyapatite $^{Ca}10\ (PO4)_6\ (OH)_2$ par substitutions au niveau des ions $Ca^{2+}$.

L'appareil permet non seulement de révéler des plages plus ou moins intensément minéralisées, mais encore de montrer que la minéralisation peut se faire au moyen d'apatites aux substitutions variables en Ca, Mg, Na et K.

2 - La microscopie ionique du tissu dentaire a permis de photographier pour la première fois l'hyperminéralisation en Mg et Ca des gaines péricanaliculaires de la dentine et de guider ainsi la microdiffraction électronique qui y a révélé la présence de Whitlockite $Ca_3\ (PO4)_2$ contenant environ 1 % de Mg.

Les premières observations dans le domaine de la pathologie dentaire ont révélé, dans la fluorose chronique, la dissociation des prismes de l'émail brunâtre avec épaississement des gaines interprismatiques.

Ces résultats n'ont pu être acquis qu'en mettant au point des techniques spéciales de préparation des échantillons biologiques calcifiés, ou plutôt en leur adaptant les procédés des minéralogistes.

Le microanalyseur ionique est actuellement un instrument plein de promesses dans le domaine biologique : il offre pour la première fois aux chercheurs une histologie chimique non destructive de très bonne résolution en surface ($\frac{1}{2}$ à 1/4 de micron) et en profondeur (50 à 100 Å) avec une sécurité de détermination sans commune mesure avec celle de l'histochimie classique. Cependant, il ne saurait se suffire à lui-même et cette étude a bien montré que c'est en faisant appel simultanément à plusieurs instruments fondés sur des principes d'investigation différents que l'on peut espérer une contribution originale à la connaissance de l'architecture complexe de la matière vivante.

# BIBLIOGRAPHIE

(1) - BLAKE, G.C. (1958). The peritubular zones in human dentine. Brit. dent. J. 104, 57-64.

(2) - CASTAING R. (1951). Application des sondes électroniques à une méthode d'analyse ponctuelle chimique et cristallographique. Thèse Doctorat ès-Sciences, Paris. ONERA, éd.

(3) - CASTAING R. (1973). Introduction sur les méthodes de la micro-analyse locale : comparaison de l'analyseur ionique et de la micro-sonde électronique. Colloque Int. sur la Physico-chimie et la Cristallographie des Apatites d'Intérêt biologique. Paris - C.N.R.S. éd.

(4) - CASTAING R et SLODZIAN G. (1962). Microanalyse par émission ionique secondaire. J. de Microscopie, 1, 395-410.

(5) - DREYFUSS, F., FRANK R.M. et GUTMANN, B. (1964). La sclérose dentinaire. Bull. Group. Int. Rech. Scient. Stomat. 7 : 207-229.

(6) - EDA, S. et TAKUMA, S. (1965). Microstructure of the peritubular matrix in horse dentin. Bull. Tokyo dent. College. 6 : 1-14.

(7) - ERICSSON, S.G. (1965). Quantitative microradiography of cementum and of abraded dentine. Acta radiol. suppl. 246.

(8) - FOURMAN P. et ROYER P. (1970). Calcium et tissu osseux (Biologie et Pathologie). Editions médicales Flammarion, Paris.

(9) - FRANK, RM. (1959). Electron microscopy of undecalcified sections of human adult dentine. Archs. Oral biol. 1 : 29-32.

(10) - FRANK, RM. (1966). Ultrastructure of human dentine. Third Europ. Symposium on Calcified Tissues (H.J. Blackwood and M. Owen ed.) Springer. Berlin. 259-272.

(11) - FRANK R.M., CAPITANT M. et GONI J. (1966). Electron Probe Studies of Human Enamel. J. dent. Res., vol 45, Sup. to n. 3, 672-682.

(12) - FRANK R.M. et VOEGEL J.C. (1973). Etude ultrastructurale de la dissolution des cristaux d'apatite au cours de la carie de l'émail dentaire humain : Coll. Int. C.N.R.S. Physico chimie et cristallographie des apatites d'intérêt biologique, Paris, C.N.R.S., Ed.

(13) - GALLE P. (1964). Mise au point d'une méthode microanalyse des tissus biologiques au moyen de la microsonde de Castaing. Rev. Franç. Etud. Clin. Biol., 9, 203-206.

(14) - GALLE P. (1965). Analyse chimique ponctuelle des inclusions intracellulaires par spectrographie des rayons X. Application à l'étude des cellules rénales. Thèse Doctorat és-Sciences. Paris, l'Expansion, Ed.

(15) - GALLE P. (1970). Sur une nouvelle méthode d'analyse cellulaire utilisant le phénomène d'"émission ionique secondaire". Ann. Phys. Biol. Méd., fasc. 4, 84-94.

(16) - GALLE P. (1974). Cellular microanalysis : a comparison between electron microprobe and Secondary ion emission microanalysis In : Microprobe analysis as applied to cells and tissues, Academic Press, Londres, p. 89-105.

(17) - GALLE P., BLAISE G. et SLODZIAN G. (1969). Study of distribution of diffusible ions in biological tissues using a secondary ion emission micro-dualyzer.
Proc. 4th nat. Conf. on Electron Microprobe Analysis, 35-36, Pasadena.

(18) - GALLE P., BLAISE G. et SLODZIAN G. (1970). Etude de la distribution des ions diffusibles dans les tissus au moyen de l'analyseur à émission ionique secondaire. 7ème Congrès Int. Micr. Electr, Grenoble.

(19) - GALLE P. et DUMERY J.P. (1971). The application of the ion microprobe to biological materials. First results. Int. Symp. on modern technology in Physiological Sciences in XX Int. Congr. of Physiological Sciences, Munich.

(20) - JEANTET A.Y., MARTOJA R. et TRUCHET M. (1974). Rôle des sphérocristaux de l'épithélium intestinal dans la résistance d'un Insecte aux pollutions minérales : données expérimentales obtenues par utilisation de la microsonde électronique et du microanalyseur par l'émission ionique secondaire. C.R. Ac. Sc. Paris, t. 278, série D, 1441-1444.

(21) - JOHANSEN, E. et PARKS, H.F. (1962). Electron microscope observations on sound human dentine. Archs. Oral Biol. 7, 185-193.

(22) - LEFEVRE R. (1973). Quelques exemples d'application à des matériaux biologiques solides de la microanalyse par émission ionique secondaire. Coll. Int. C.N.R.S. Physico-chimie et Cristallographie des Apatites d'intérêt biologique, Paris, C.N.R.S. éd.,

(23) - LEFEVRE R. (1975). La microanalyse par émission ionique secondaire et son application aux tissus calcifiés humains. Coll. S.F.M.E. Techniques et applic. de la microanalyse en Biologie, Créteil. J. de Micr. et Biol. Cell., sous presse.

(24) - LEFEVRE R., FRANK R. et VOEGEL J.C. (1975a). The study of human dentine with secondary ion microscopy and electron diffraction. Calcified Tissue Research (sous presse).

(25) - LEFEVRE R., FRANK R., VOEGEL J.C. (1975b). Secondary ion microscopy and electron diffraction of human peritubular dentin. Int. Ass. Dental Research, Londres, J. Of Dental Research, sous presse.

(26) - LODDING A., GOURGOUT J.M., PETERSSON L.G. et FROSTELL G. (1974). Aspects of quantitative determination by Ion Probe of Fluorine concentrations in Apatites. Z. Naturforsch., 29 a, 897-900.

(27) - Mc CONNEL D. (1973) - Apatite. Its crystal chemisty, mineralogy, Utilisation, and geologic and Biologic Occurences. Applied Mineralogy, 5, Springer-Verlag, Vienne - New-York.

(28) - MILLER, W.A., EICK J.D. et NEIDERS, M.E. (1971) Inorganic components of the peritubular dentin in young human permanent teeth. Caries Res. 5, 264-278.

(29) - MONTEL G. (1973). Conceptions actuelles sur la structure et la construction des apatites synthétiques comparables aux apatites biologiques. Coll. Int. du C.N.R.S. sur la physico-chimie et la cristallographie des apatites d'intérêt biologique. Paris, C.N.R.S.

(30) - [illegible] G., FRYKHOLM G. et LODDING A. (1974). Secondary Ion Microanalysis of Fluorine in Apatites of biological interest. Z. Naturfirsch, 29 c, 417-420.

(31) - SLODZIAN G. (1963). Etude d'une méthode d'analyse locale chimique et isotopique utilisant l'émission ionique secondaire. Thèse Doctorat-ès-Sciences, Orsay. Ann. de Physique, 1964, 9, 13, 591-632.

(32) - SLODZIAN G. (1968). Microanalyseur ionique. Rev. de Phys. Appliquée. 3, 360.

(33) - SLODZIAN G. (1972). Microscopie ionique par émission secondaire. Ecole d'été de Villard-de-Lans, 18-29 Septembre, inédit.

(34) - TAKUMA S. (1960). Electron microscopy of the structure around the dentinal tubule. J. dent. res. 39, 973-981.

(35) - TAKUMA S., KATAGIRI S. et OZASA S. (1966). Electron-probe microanalysis of horse dentin. J. Electron Micros. 15, 86-89.

(36) - TOUSIMIS A.J. (1972). Secondary ion and electron probe microanalysis of the mineralisation process in biological tissues. Proc. VII$^{ch}$Nat. conf. Electron probe analysis. San Francisco, 45 A, B, C.

(37) - TRUNSTAD L. (1973). Quantitative microradiography of intact and worn human coronal dentine. Archs. Oral Biol. 18, 533-542.

(38) - TRUCHET M. (1973). Microanalyse par émission ionique secondaire sur coupes histologiques. J. de Microscopie, vol 17, 103a-104a.

(39) - TRUCHET M. (1974). Application de la micro-analyse par émission ionique secondaire aux coupes histologiques = localisation des principaux isotopes de divers éléments. Thèse 3e cycle Histologie, Paris, inédite.

(40) - TRUCHET M. (1975). Application aux coupes histologiques de la microanalyse par émission ionique secondaire. Méthodologie et principaux résultats. Coll. S.F.M.E. Techniques et Applic. de la Microanalyse en Biologie . Créteil, J. de Micr et Biol. Cell., sous presse.

(41) - TRUCHET M. et MARTOJA R. (1973). Mise en évidence et localisation histologique, par microsonde électronique, d'une accumulation naturelle d'aluminium et de silicium dans le foie de Ranatemporia (Vertébré, Amphibien). C.R. al. Sc. Paris, t. 276, série D, 995-997.

(42) - WEBER, D.F. (1974). Human dentine sclerosis : a micro-radiographic survey. Archs. Oral Biol. 19, 163-169.

(43) - ZAPANTA LEGEROS R. (1974). Variations in the crystalline components of human dental calculus. I - Crystallographic and spectroscopic methods of analysis. J. dent. Res. 53, 45-50.

(44) - LESTER, K.S. et BOYDE, A. (1968). The surface morphology of some crystalline components of dentine. In "Dentine and pulp : their structure and reactions" (N.B.B. symons ed.) 197-219. Livingstone. Londres.

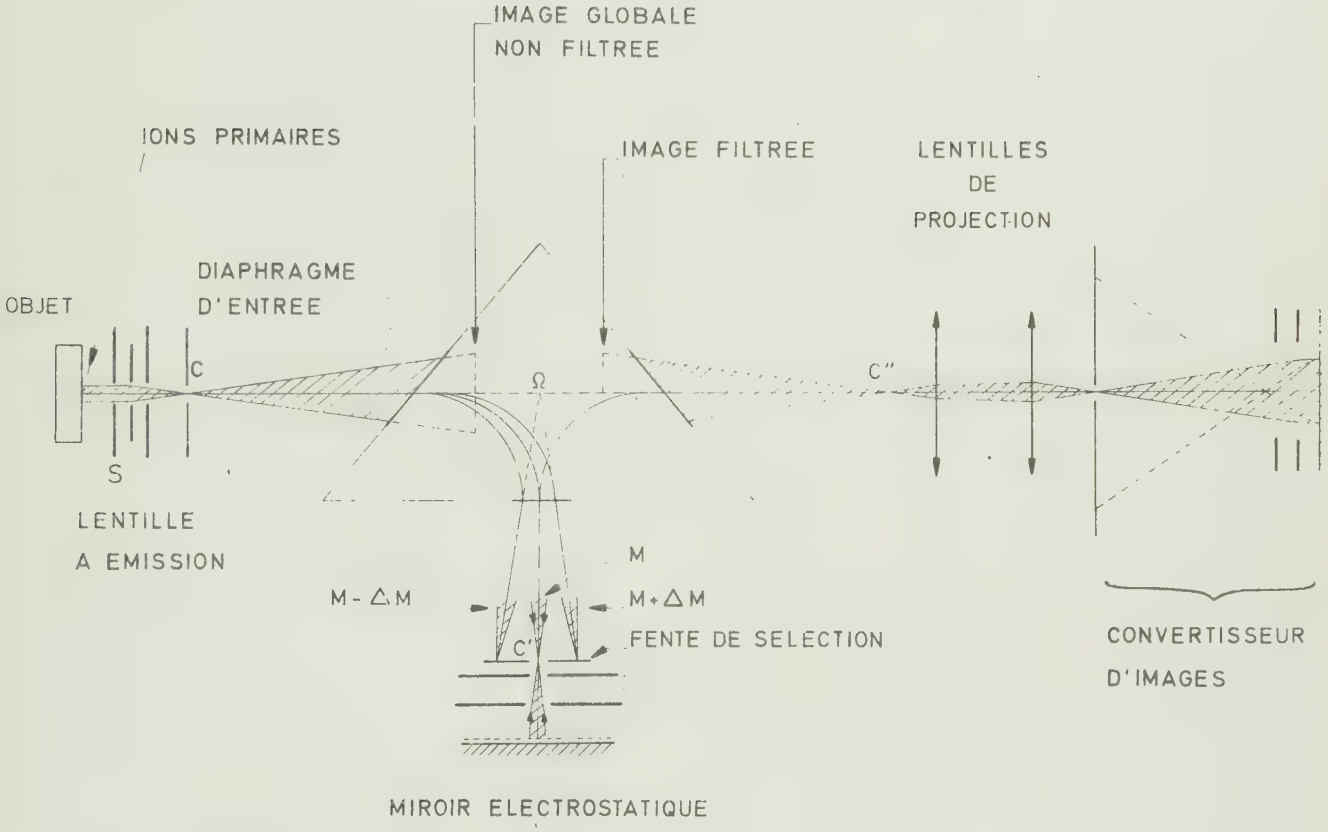



Fig. I-Schéma du principe du microanalyseur ionique.

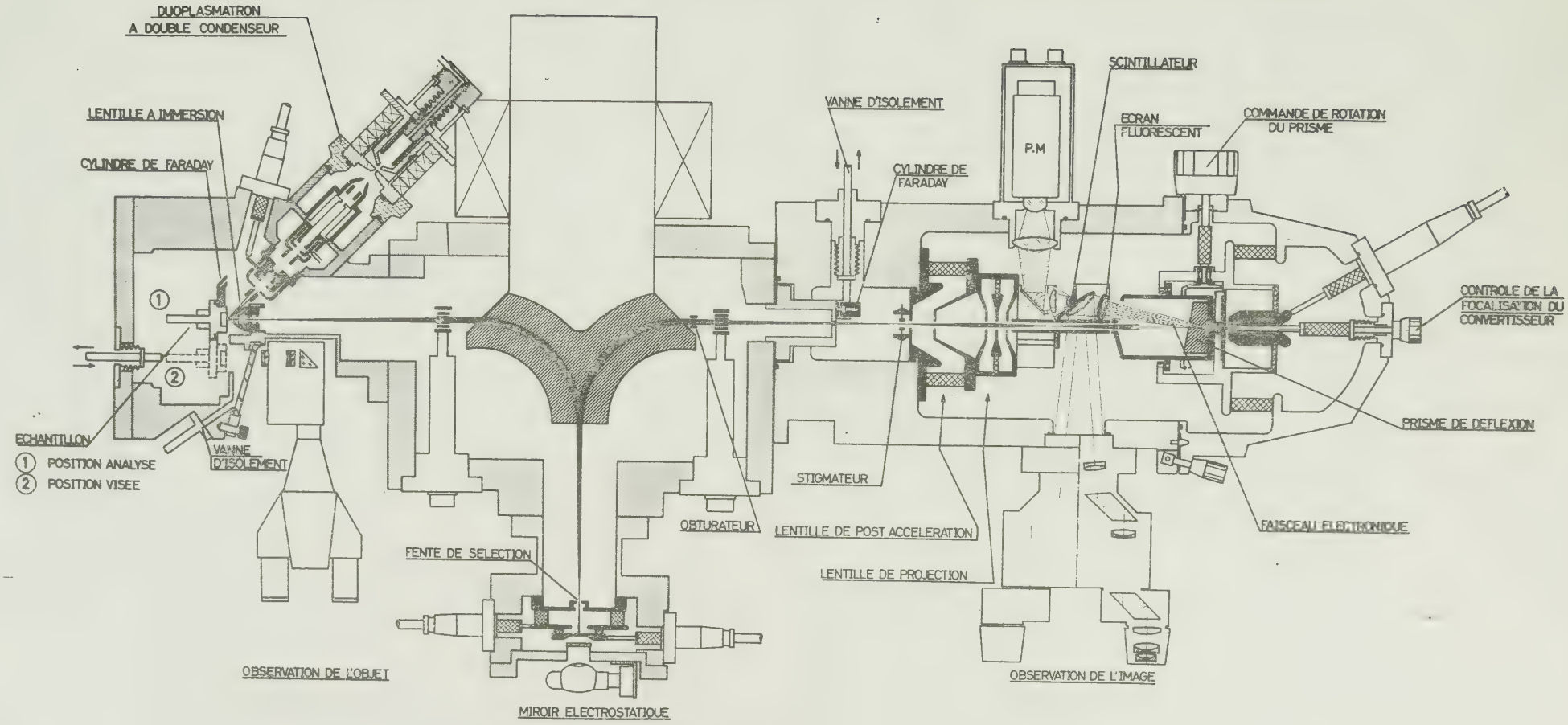



Fig. 2- Schéma de construction du microanalyseur ionique SMI 300 CAMECA.

Fig. 3 - Microscopie ionique d'un os normal. Fémur d'un enfant de 2 ans $\frac{1}{2}$. Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, Paris. Echantillon G. WITMER.

Répartition des ions Ca, Mg, Na et K.

Bombardement primaire : $O^+_2$.

Ions secondaires positifs.

Temps de pose : Ca : $\frac{1}{2}$ s.

Mg : 20 s.

Na : 2 s.

K : 10 s.

Distance entre deux barreaux de la grille d'aluminium : 150 microns environ. Cette dernière apparaît en noir.

La concomitance des renforcements de minéralisation en Ca, Mg, Na et K suggère qu'il s'agit, durant tout le processus d'ostéogenèse, de la même hydroxyapatite, c'est-à-dire substituée de la même façon.

Fig. 4 - Microscopie et microanalyse électroniques par balayage d'un os normal.

Fémur d'un enfant de 2 ans ½. Hôpital Saint-Vincent-de-Paul, Paris, Echantillon G. WITMER. Clichés CAMECA, Courbevoie.

La microscopie électronique par balayage met bien en évidence les canaux de Havers et les lacunes ostéocytaires. Il s'agit des mêmes sections polies que celles étudiées par microanalyse ionique (fig. 3). La grille en aluminium est bien visible sur le cliché x 100. (Equidistance des barreaux : 150 microns environ).

La microsonde électronique utilisée en balayage ne révèle, pour des temps de pose de 5 et 10 minutes environ que les lacunes des canaux de Havers sur les clichés Mg et Ca. Aucune des structures (lignes concentriques hyperminéralisées dans les ostéones, lignes cimentantes) mises en évidence à l'analyseur ionique en 20 s. et 0,5 s. ne sont visibles (cf. fig. 3). La microsonde a analysé les parties de l'objet sous les barreaux de la grille en aluminium (épaisseur approximative : 5 microns) illustrant bien le phénomène de pénétration diffuse des électrons.

Fig. 5 - Microscopie ionique d'un os pathologique. Biopsie de crête iliaque d'un enfant en insuffisance rénale chronique soumis à des dialyses périodiques. Clinique des Maladies du Métabolisme et du Rein, Pr. P. ROYER, Hôpital des Enfants Malades, Paris. Echantillon G. WITMER.

Répartition des ions Na, Mg, K et Ca.

Bombardement primaire : $O^+_2$.

Ions secondaires positifs.

Temps de pose : Na : 5 s.

Mg : 50 s.

K : 20 s.

Ca : $\frac{1}{2}$ s.

Distance entre deux barreaux de la grille en aluminium : 150 microns environ.

Des plages entières, limitées par des lignes cimentantes, montrent des différences de composition chimique. Les parties les plus profondes de la travée osseuse sont plus riches en Na-Ca et plus pauvres en Mg-K que les parties les plus récentes, proches de la moelle. Ceci suggère l'idée que les édifices osseux successifs se sont réalisés avec des hydroxyapatites différemment substituées en Na, K et Mg et avec des densités minérales différentes.

Fig. 6 - Microscopie ionique d'une dent normale au contact émail-ivoire.
Echantillon Pr. SCHEFFER, Hôpital de Villeneuve-Saint-Georges.
Extrait de (22), fig. 3, p. 145.

Répartition des ions Ca.

Temps de pose : $\frac{1}{2}$ s.

Bombardement primaire : $O^+_2$.

Ions secondaires positifs.

Champ de l'image : 250 microns.

Les fissures non minéralisées dans l'émail sont probablement des artéfacts de préparation. Par contre, l'aspect caractéristique des buissons de l'émail noueux et des canalicules de la dentine, est bien observable. Les sections sont voisines d'un plan parallèle à l'axe "c" d'allongement des prismes de l'émail.

Fig. 7 - Microscopie ionique d'une section transversale de dent normale au contact ivoire-pulpe. Echantillon Pr. SCHEFFER, Hôpital de Villeneuve-Saint-Georges. Extrait de (22), fig. 4, p. 146.

Répartition des ions Na, Mg, P, Ca, CaO et CaOH.

Les temps de pose respectifs sont indiqués sur le cliché.

Bombardement primaire : $O^+_2$.

Distance entre deux barreaux de la grille en aluminium : 150 microns environ.

Les canalicules de la dentine, vides, apparaissent en noir, les uns sectionnés longitudinalement, les autres transversalement. Ils sont entourés d'une gaine hyperminéralisée assez bien visible sur le cliché Mg. Une zone triangulaire dans le secteur NW correspond à une plage de sclérose contenant deux canalicules obturés, bien repérables à leur gaine magnésienne.

Fig. 8 - Microscopie ionique de l'ivoire d'une dent normale. Echantillon Pr FRANK, Faculté de Chirurgie dentaire, Strasbourg.

Répartition de Mg et Ca.

Temps de pose : Mg : 10 s.

Ca : 1/10 s.

Bombardement primaire : $O^+_2$.

Ions secondaires positifs.

Distance entre deux barreaux de la grille en aluminium : 150 microns environ.

Les gaines hyperminéralisées situées autour des canalicules dentinaires sont bien visibles, surtout sur les clichés Mg. L'assombrissement de la partie centrale des deux mailles supérieures sur ces derniers clichés ne traduit pas un déficit de concentration : il s'agit du phénomène de charge électrique dont la géométrie admet pour éléments de symétrie ceux de la grille conductrice. Les deux évaporations successives nécessaires au dépôt de cette dernière n'ayant pas été faites à angle droit, les mailles ont une forme losangique.

Fig. 9 - Microscopie et microanalyses électroniques par balayage de l'ivoire d'une dent normale. Echantillon Pr. R. FRANK, Faculté de Chirurgie dentaire, Strasbourg. Clichés CAMECA, Courbevoie.

Il s'agit du même échantillon que celui étudié à l'analyseur ionique sur la figure 8.

Les canalicules dentinaires apparaissent sur les clichés pris au microscope électronique à balayage.

Malgré les temps de pose longs, les gaines péricanaliculaires hyperminéralisées mises en évidence sur la figure 8 n'apparaissent pas en balayage par sonde électronique.

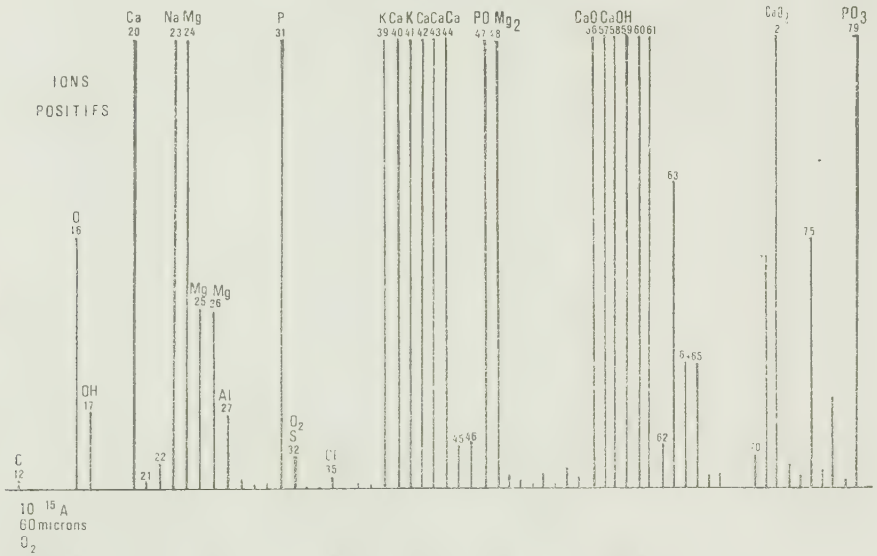
Fig. 10 - Microscopie électronique par balayage et traversée en Mg à la microsonde électronique de l'ivoire d'une dent normale. Echantillon Pr. FRANK, Faculté de Chirurgie Dentaire, Strasbourg, Clichés CAMECA, Courbevoie.

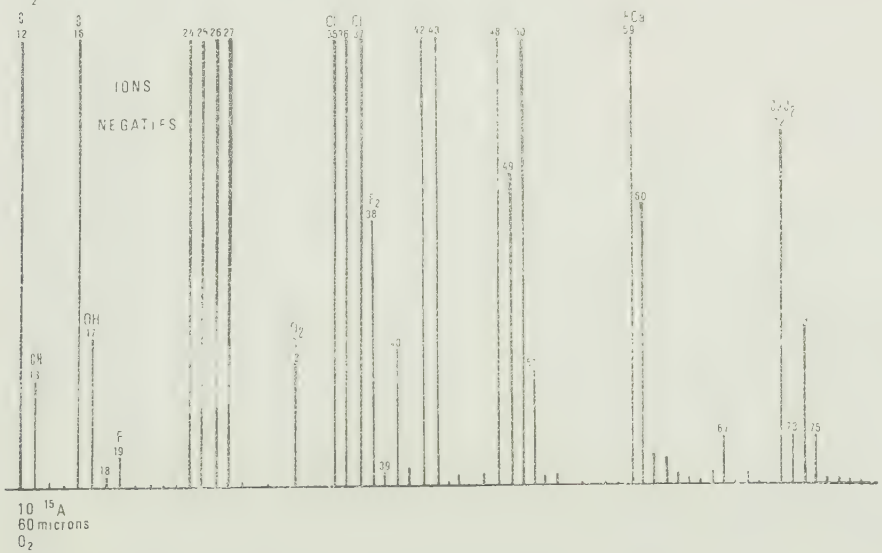
Il s'agit des mêmes régions que celles des figures 8 et 9.

Le microscope électronique à balayage révèle une cristallinité plus grande du tissu dentinaire sur le pourtour des canalicules, ainsi que l'état de la surface hérissée de spicules après l'érosion ionique.

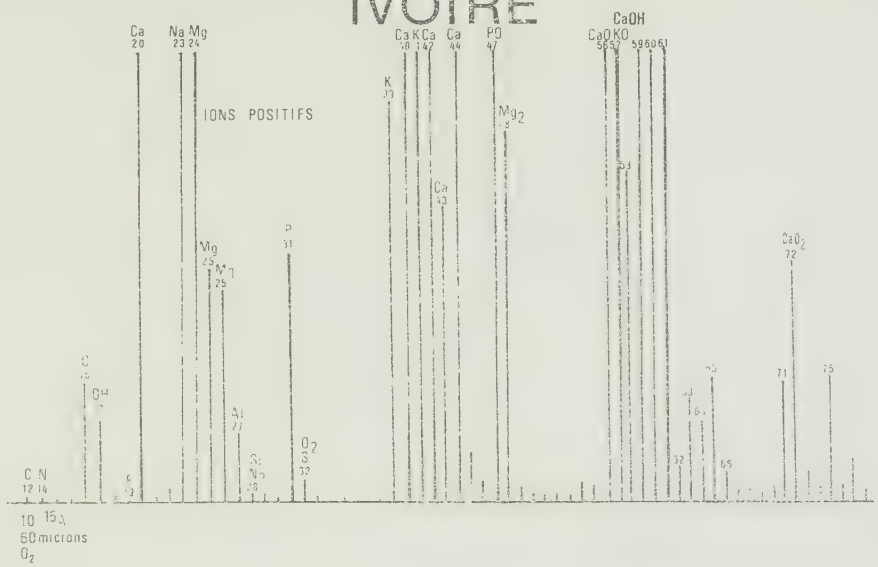
La traversée en Mg, effectuée à la microsonde électronique, ne met pas en évidence le renforcement révélé par l'analyseur ionique à la périphérie immédiate des canalicules.

# EMAIL




# IVOIRE



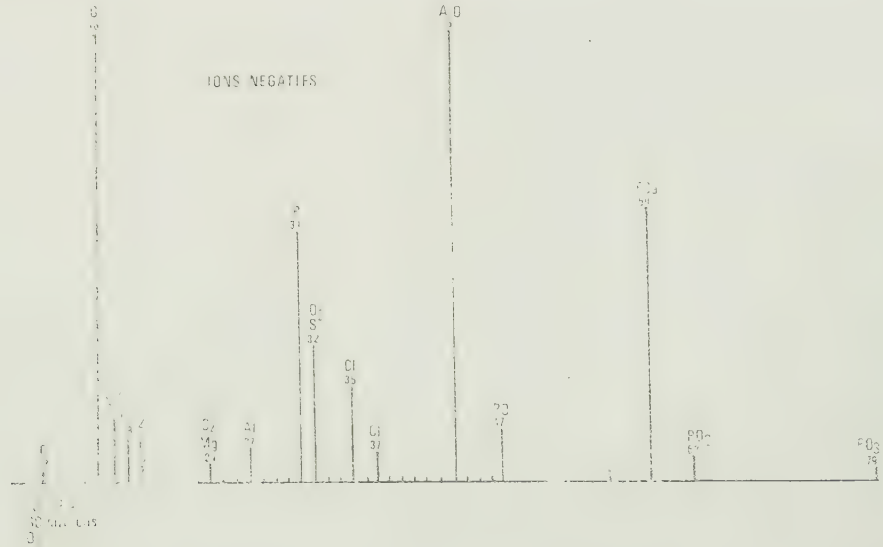



Fig. 11 - Spectrogrammes des masses présentes dans les faisceaux ioniques secondaires positifs et négatifs, émis par l'émail et l'ivoire d'une section transversale de dent normale sous l'effet d'un bombardement primaire d'$O_2^+$.

Le champ-objet analysé est de 60 microns.

Les spectrogrammes ne sont donnés qu'à titre purement qualitatif. En effet, un grand nombre de raies étant saturées pour la gamme de courant secondaire choisie, on ne peut en tirer de renseignements même semi-quantitatifs.

Fig. 12 - Microscopie ionique de l'émail superficiel d'une dent pathologique (Fluorose chronique), Echantillon Pr FRANK, Faculté de Chirurgie dentaire, Strasbourg.

Répartition de Na, Mg, K, Ca, et FCa.

Temps de pose : Na : 2 s.

Mg : 50 s.

K : 20 s.

Ca : 1/5 s.

FCa : 20 s.

Bombardement primaire : $O^+_2$.

Ions secondaires positifs.

Equidistance des barreaux de la grille en aluminium : 150 microns environ.

La dissociation des prismes d'apatite est très nette. La teneur en fluor, traduite par celle de FCa, semble décroître rapidement depuis la partie superficielle de l'émail. Les sections sont perpendiculaires à l'axe "c" d'allongement des prismes de l'émail.

# TABLE DES ILLUSTRATIONS.

I - Schéma de principe du microanalyseur ionique.

2 - Schéma de construction du microanalyseur ionique SMI 300 CAMECA.

3 - Microscopie ionique d'un os normal (Fémur d'un enfant de 2 ans $\frac{1}{2}$). Répartition de Ca, Mg, Na et K.

4 - Microscopie et microanalyse électroniques par balayage d'un os normal (Fémur d'un enfant de 2 ans $\frac{1}{2}$). Répartition de Mg et Ca.

5 - Microscopie ionique d'un os pathologique (Biopsie de crête iliaque d'enfant en insuffisance rénale chronique). Répartition de Na, Mg, K et Ca.

6 - Microscopie ionique d'une dent normale au contact émail-ivoire. Répartition de Ca.

7 - Microscopie ionique d'une section transversale de dent normale au contact ivoire-pulpe. Répartition de Na, Mg, P, Ca, CaO et CaOH.

8 - Microscopie ionique de l'ivoire d'une dent normale. Répartition de Mg et Ca.

9 - Microscopie et microanalyse électroniques par balayage de l'ivoire d'une dent normale. Répartition de Ca et Mg.

IO - Microscopie électronique par balayage et traversée en Mg à la microsonde électronique de l'ivoire d'une dent normale.

II - Spectrogrammes des masses présentes dans les faisceaux ioniques positifs et négatifs émis par l'émail et l'ivoire d'une dent normale.

I2 - Microscopie ionique de l'émail superficiel d'une dent pathologique (Fluorose chronique). Répartition de Na, Mg, K, Ca et FCa.

Vu le Président de Thèse : Professeur Pierre ROYER

Vu le Doyen de la faculté : Professeur H. JEROME

Vu et permis d'imprimer
le Président de l'Université

Professeur J. FREZAL